

Aus der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

UNTERSUCHUNGEN ZU WIRKSAMKEIT, VER-
TRÄGLICHKEIT UND WIRKMECHANISMEN DER
GLUCOCORTICOIDE BEI PATIENTEN MIT ENT-
ZÜNDLICH-RHEUMATISCHEN ERKRANKUNGEN

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Burkhard Bartholome

aus Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Frank Buttgereit

2. Prof. Dr. Rainer H. Straub

3. Prof. Dr. Andreas Krause

Datum der Promotion: 19.4.2004

Gliederung:

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 10 |
| 1.1 | Wirkmechanismen der Glucocorticoide | 11 |
| 1.2 | Glucocorticoidwirkungen und Osteoporose | 17 |
| 1.3 | Zielsetzung | 18 |
| 2 | Material und Methoden | 20 |
| 2.1 | Untersuchungen zu Wirkungen, Nebenwirkungen und Lebensqualität bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unter low-dose Glucocorticoidtherapie am Beispiel von Methylprednisolon | 20 |
| 2.1.1 | Patienten | 20 |
| 2.1.2 | Erfassung der Patientendaten | 20 |
| 2.1.3 | Fragebogen zum Gesundheitszustand | 22 |
| 2.1.4 | Bestimmung der Knochendichte | 22 |
| 2.1.5 | Blut- und Urinuntersuchungen | 23 |
| 2.2 | Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren | 24 |
| 2.2.1 | CCRF-CEM- (CCL 119-) Zelllinie | 24 |
| 2.2.1.1 | Morphologie | 24 |
| 2.2.1.2 | Wachstumskinetik | 25 |
| 2.2.2 | Präparation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) | 26 |
| 2.2.3 | Durchflusszytometrie | 26 |
| 2.2.3.1 | Prinzip der Durchflusszytometrie | 26 |
| 2.2.3.2 | Testsystem zur Detektion von zytosolischen und membranständigen Glucocorticoidrezeptoren | 28 |
| 2.2.3.3 | Herstellung des <i>anti</i> GCR-Digoxigenin-Konjugats (<i>anti</i> GCR-Dig-Konjugat) | 30 |
| 2.2.3.4 | Hochsensitive Immunfluoreszenz mit magnetofluoreszenten Liposomen | 31 |
| 2.2.3.5 | Prinzipielles methodisches Vorgehen | 31 |
| 2.2.3.6 | Färbung mit <i>anti</i> GCR-Dig-Antikörpern | 32 |
| 2.2.3.7 | Optimierung der Färbung durch Sekundärreagenzien | 33 |
| 2.2.3.8 | Detektion der Cluster of Differentiation (CD) 3, 14 und 19 | 33 |
| 2.3 | Bestimmung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit rheumatoider Arthritis | 34 |
| 2.4 | Statistische Methoden | 35 |
| 2.4.1 | Klinische Studie | 35 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.2 | Durchflusszytometrische Experimente | 35 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Klinische Studie | 37 |
| 3.1.1 | Charakterisierung der Patienten und der Vergleichsgruppen | 37 |
| 3.1.2 | Ergebnisse der einzelnen Parameter | 38 |
| 3.1.2.1 | Knochendichte | 38 |
| 3.1.2.2 | Knochenumsatzparameter | 40 |
| 3.1.2.3 | Schmerzen der Wirbelsäule (Osteoporoseschmerzen) | 40 |
| 3.1.2.4 | Cushing-Symptomatik | 41 |
| 3.1.2.5 | Typische Hautveränderungen bei Glucocorticoidtherapie | 42 |
| 3.1.2.6 | Veränderung des Augeninnendrucks | 43 |
| 3.1.2.7 | Krankheitsaktivitätsparameter | 43 |
| 3.1.2.8 | Blutfette | 43 |
| 3.1.2.9 | Lebensqualität | 43 |
| 3.2 | Durchflusszytometrische Experimente | 48 |
| 3.2.1 | Ableitung der Standardisierungsbedingungen | 48 |
| 3.2.1.1 | Messung der mGCR-Expression auf CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit nach Auftauen | 48 |
| 3.2.1.2 | Optimierung des Antikörper-Färbesystems | 48 |
| 3.2.1.3 | Antikörper-Konjugation, Färbe- und Block-AK-Konzentrationen | 49 |
| 3.2.1.4 | Blockade durch Vorinkubation der <i>anti</i> GCR-AK mit dem Antigen APTEK26 | 49 |
| 3.2.2 | Intrazelluläre Färbung der CCRF-CEM-Zellen | 50 |
| 3.2.3 | Vergleich der konventionellen Oberflächenfärbung mit der Liposomenfärbung | 51 |
| 3.2.4 | Untersuchungsergebnisse gesunder Probanden | 52 |
| 3.2.5 | Systematische Untersuchung von Probanden mit Hepatitis B-Impfung | 53 |
| 3.2.6 | Messung der mGCR auf PBMC einer unbehandelten SLE-Patientin | 56 |
| 3.2.7 | Messung der mGCR auf PBMC von Patienten mit rheumatoider Arthritis | 56 |
| 3.2.8 | Messung auf Granulozyten | 61 |
| 4 | Diskussion | 62 |
| 4.1 | Untersuchungen zu Wirkungen, Nebenwirkungen und Lebensqualität bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unter low-dose Glucocorticoidtherapie am Beispiel von Methylprednisolon | 62 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.1 | Unerwünschte Wirkungen | 63 |
| 4.1.2 | Kontrolle der Krankheitsaktivität | 67 |
| 4.1.3 | Befragung zur Lebensqualität | 68 |
| 4.1.4 | Zusammenfassung | 69 |
| 4.2 | Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren | 71 |
| 4.2.1 | Nachweis von mGCR auf humanen PBMC | 74 |
| 4.2.2 | Zusammenfassung | 80 |
| 5 | Zusammenfassung | 82 |

Abstract

Schlagworte:

low-dose Glucocorticoidtherapie, entzündlich-rheumatische Erkrankungen, membranständige Glucocorticoidrezeptoren, nicht-genomische Glucocorticoideffekte, hoch-sensitive Immunfluoreszenzfärbung

Ziel:

Gewinnung neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Glucocorticoidforschung. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

1. Klinische Studie zu Wirkungen und Nebenwirkungen einer niedrig bis mittelhoch dosierten Methylprednisolon(MP)-Therapie bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.
2. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit humanen PBMC mit dem Ziel, membranständige Glucocorticoidrezeptoren (mGCR) nachzuweisen.

Methodik:

1. In einer klinischen Studie wurden zwei Patientengruppen mit jeweils 20 Patienten miteinander verglichen. Alle Patienten hatten entzündlich-rheumatische Erkrankungen und bekamen eine MP-Therapie über mindestens ein Jahr. Die Dosierungen in der ersten Gruppen entsprachen einer low-dose GC-Therapie, die Patienten in der zweiten Gruppe bekamen eine medium-dose GC-Therapie.
Erwünschte, unerwünschte Wirkungen sowie die Lebensqualität der Patienten wurden erhoben.
2. Humane PBMC wurden durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden konventionelle Färbemethoden sowie eine hoch-sensitive Liposomenfärbung zur Detektion spezifischer membranständiger Antigene angewandt.

Ergebnisse:

1. In den meisten Fällen waren die relativ niedrigen Dosierungen von MP geeignet, die Krankheitsaktivität der entzündlich-rheumatischen Erkrankung wirksam zu kontrollieren. Einzelne Exazerbationen waren allerdings zu verzeichnen.
Bei den meisten unerwünschten Wirkungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Dosisgruppen. Osteoporosetypische Rückenschmerzen traten signifikant höher in

der oberen Dosisgruppe auf ($p=0,04$), bei dem erhöhten Augeninnendruck zeigte sich eine Tendenz ($p=0,1$).

Häufige Nebenwirkungen auch bei niedrigen Dosierungen waren: Unterblutungen der Haut und Pergamenthaut (76,2 % bzw. 73,8 % aller Patienten) bzw. eine Cushing-Symptomatik (61,9 % aller Patienten).

2. Mit der Liposomen-Färbetechnik ließen sich erstmals mGCR auf humanen PBMC systematisch nachweisen. Bis zu 5 % der B-Lymphozyten und bis zu 7 % der Monozyten exprimierten mGCR bei Gesunden.

Stimulationen des Immunsystems durch Impfungen oder eine aktive rheumatoide Arthritis führten zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils mGCR-positiver Monozyten auf über 20 %.

Schlussfolgerungen:

1. Niedrig bis mittelhoch dosierte Therapien mit MP können effektiv die Aktivität von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen kontrollieren. Die unerwünschten Effekte sind vermutlich dosisabhängig, für die meisten ist jedoch nicht relevant, ob mit einer low-dose oder einer medium-dose Therapie behandelt wird.
2. mGCR werden auf humanen PBMC unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Unter bestimmten immunologischen Bedingungen werden sie hochreguliert. Herkunft und Funktion der Rezeptoren müssen noch genauer geklärt werden.

Abstract

Keywords:

low-dose glucocorticoid-therapy, inflammatory rheumatic diseases, membrane-bound glucocorticoid receptors, non-genomic glucocorticoid effects, high-sensitive immunofluorescent labelling

Purpose:

Gaining new knowledge in glucocorticoid research. The dissertation -consists of two parts:

1. Clinical study on effects and side-effects of a low-dose / medium-dose therapy with methylprednisolone (MP) in patients with inflammatory rheumatic diseases.
2. Flowcytometric investigation of human PBMC in order to detect membrane-bound glucocorticoid-receptors (mGCR).

Methods:

1. In a clinical study two groups of patients - 20 patients each - were compared. All patients had inflammatory rheumatic diseases and received MP-therapy for at least one year. The first group received a low-dose GC-therapy, the second group a medium-dose GC-therapy.
2. Human PBMC were examined. We used conventional and high-sensitive liposome staining technique for the detection of specific membrane-bound antigens.

Results:

1. In most cases rather low dosages of MP were able to control the disease activity of inflammatory rheumatic diseases. However, we observed disease exacerbation in some cases.

Most side-effects showed the same characteristics in both groups. There was a significant higher appearance of typical osteoporotic back pain in the higher dosage group ($p=0,04$) and a tendency to higher intraocular pressure in this group ($p=0,1$).

Common side effects with even low dosages were: skin hematoma and thin skin (76,2 % and 73,8 % respectively) and a Cushing-Syndrome (61,9 % of all patients).

2. With the liposome staining technique we showed for the first time systematically mGCR on human PBMC. Up to 5 % of B-lymphocytes and 7 % of monocytes presented mGCR in healthy blood donors.

Stimulation of the immunological system by vaccination or in case of an active rheumatoid arthritis led to a marked increase of mGCR-positive monocytes to more than 20 %.

Conclusions:

1. Low-dose and medium-dose methylprednisolone therapy can effectively control the activity of inflammatory rheumatic diseases. The side effects are probably dose-dependent. However, for most side effects it doesn't matter if patients are treated with a low-dose or a medium-dose therapy.
2. mGCR are expressed on human PBMC under physiological conditions and are up-regulated under certain immunological conditions. The function of these receptors has to be examined more profoundly.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AP-1 | Activating Protein 1 |
| APC | Allophycocyanin |
| BMD | Bone Mass Density |
| BSG | Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cGCR | zytosolische (= intrazelluläre) GCR |
| CD | Cluster of Differentiation |
| COX | Cyclooxygenase |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAS | Disease Activity Score |
| DEXA | Dual Energy X-Ray Absorptiometry |
| Dig | Digoxigenin |
| DMARD | Disease Modifying Antirheumatic Drug |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| GC | Glucocorticoide |
| GCR | Glucocorticoidrezeptoren |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| iGCR | intrazelluläre (= zytosolische) GCR |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| Kn-AP | knochenspezifische alkalische Phosphatase |
| LC1 | Lipocortin 1 |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| mGCR | membranständige GCR |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| MP | Methylprednisolon |
| NF-κB | Nuclear factor kappa B |
| NSAID | Non-Steroid Antiinflammatory Drug |
| NSAR | nicht-steroidale Antirheumatika |
| PÄ | Prednisolon-Äquivalent |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridininchlorophyll-a |
| PKC | Proteinkinase C |
| SF-36 | Short Form-36-Fragebogen |
| Src | Steroid receptor activator |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| VAS | Visuelle Analogskala |

1 Einleitung

Glucocorticoide spielen eine große Rolle bei der Behandlung unterschiedlichster Krankheitsbilder. Von Bedeutung sind dabei vor allem die entzündungshemmenden und immunsuppressiven bzw. immunmodulierenden Wirkungen. 1948 setzte Philip S. Hench Glucocorticoide erstmals erfolgreich zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis ein, seitdem sind sie aus vielen Bereichen der Klinik nicht mehr wegzudenken. Die Forschungsergebnisse zu diesen Medikamenten sind bereits umfangreich, dennoch ist längst nicht alles über Wirkungen, Nebenwirkungen und Funktionsweise bekannt. In der über 50jährigen Geschichte der klinischen Anwendung der Glucocorticoide hat es sehr konträre Meinungen über deren Vor- und Nachteile gegeben. Dies ist zurück zu führen auf die überaus erfolgreichen Behandlungserfolge einerseits, die Risiken ihrer Anwendung andererseits.

Die Anwendungsgebiete, wie auch die eingesetzten Dosierungen sind weit gefächert. Glucocorticoide werden in der Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt, bei der Behandlung des anaphylaktischen Schocks, bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen oder bei Patienten mit Multipler Sklerose. Bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis sind sehr niedrige[1] bis sehr hohe Dosen[2, 3, 4] je nach Krankheitsstadium erfolgreich. Ultrahohe Dosen werden bei der Behandlung von Schädel-Hirn-Traumata eingesetzt.[5, 6] Die Dosierung richtet sich nach der zugrundeliegenden Erkrankung, deren Aktivität sowie patientenspezifischen Parametern, wie zum Beispiel einer kombinierten Therapie mit anderen Immunsuppressiva. Sehr niedrige Dosierungen (bis zu 10 mg/d Prednisolonäquivalent) finden besonders in der Langzeittherapie Anwendung, niedrige (bis 0,25 mg/kg KG/d) bis mittelhohe (bis 1 mg/kg KG/d) in der mittelfristigen Therapie, hohe (> 1 mg/kg KG/d) oder ultrahohe (> 1 g) werden zur kurzfristigen Behandlung schwerster lebensbedrohlicher Zustände eingesetzt.

Die unerwünschten Wirkungen der Glucocorticoide sind breit dokumentiert. Dennoch fehlen verlässliche Daten über deren Häufigkeit, gerade auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosierung. So wurde früher beispielsweise die Cushing-Schwellendosis mit 7,5 mg Prednisolonäquivalent/d angegeben. Dies ist die Dosis, ab der bei chronischer Anwendung die Entstehung eines Cushing-Syndroms wahrscheinlich ist. Heute geht man eher von einer individuellen Schwellendosis aus, wonach unerwünschte Wirkungen neben der Dosis abhängig von Alter, Geschlecht und Krankheit sind.[7]

Das Ziel einer jeden GC-Therapie ist die suffiziente Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung bei gleichzeitiger Minimierung der unerwünschten Wirkungen. Es wird versucht, dieses Ziel durch einen kurzen Behandlungszeitraum oder eine niedrig dosierte Dauertherapie (low-

dose Glucocorticoidtherapie) zu erreichen. Vor zehn Jahren wurde unter einer low-dose GC-Therapie noch eine Dosierung von unter 10 mg Prednisolon-Äquivalent(PÄ)/die verstanden. Heute geht man bei diesem Begriff von deutlich geringeren Tagesdosen aus. Während bei Dosierungen bis zu 10 mg PÄ/die zum Beispiel die Osteoporose als schwere NW häufig auftritt,[8] sind laut Hatz bei Dosierungen $\leq 5 - 6$ mg/die Wirkungen ohne das übliche NW-Profil zu erreichen.[7] Unterhalb von 5 mg Prednisolon-Äquivalent fand sich bei Helmke keine Verringerung der Knochendichte.[9] Caldwell et al. fanden unterhalb von 7,5 mg PÄ/die keine statistische Häufung einer Osteoporose.[10] Bei Saag et al. wird die Grenze von 5 mg/die genannt, ab der die spezifischen unerwünschten Wirkungen dosisabhängig zunehmen.[11] Bei van Staa et al. zeigten Patienten mit durchschnittlich $> 7,5$ mg PÄ/die ein signifikant erhöhtes Frakturrisiko gegenüber Patienten, die weniger als 2,5 mg PÄ/die bekamen.[12] Das relative Risiko auf vertebrale Frakturen stieg von 1,55 bei $< 2,5$ mg PÄ/die auf 5,18 bei $> 7,5$ mg PÄ/die.[13] Dieses Ergebnis zeigt, dass auch Dosen $< 2,5$ mg PÄ/die das Frakturrisiko erhöhen können. Und auch de Nijs et al. fanden, dass jegliche Erhöhung der GC-Dosis um 1 mg das Risiko auf eine Wirbelfraktur erhöht.[14] Nach diesen neueren Publikationen ist fraglich, ob es überhaupt eine „sichere“ Dauerbehandlung mit GC im Hinblick auf die unerwünschten Wirkungen gibt. Auch mehr als 50 Jahre nach dem ersten klinischen Einsatz der GC ist noch nicht alles über deren Wirkmechanismen bekannt. Erst vor wenigen Jahren wurde ein Modell entwickelt, wo den lange bekannten genomischen Effekten nicht-genomische an die Seite gestellt werden.

1.1 Wirkmechanismen der Glucocorticoide

Man geht heute von drei unterschiedlichen Wirkmechanismen aus:

1. Genomische Wirkmechanismen
2. Spezifische nicht-genomische Wirkmechanismen
3. Unspezifische nicht-genomische Wirkmechanismen

Buttgereit et al. stellten 1998 eine „modulare Hypothese“ auf, wonach bei niedrigen Dosierungen zunächst genomische Effekte wirksam werden ($> 10^{-12}$ mol/l). Ab Dosierungen von ca. 10^{-9} mol/l spielten zusätzlich spezifische nicht-genomische Effekte (vermittelt über membranständige Rezeptoren) eine Rolle. Bei hohen Dosierungen ($> 10^{-4}$ mol/l) kommt es nach dieser Hypothese außerdem zu unspezifischen nicht-genomischen Wirkungen über physikochemische Effekte in Form von Interkalierung der Steroidmoleküle in der Zellmembran (Abb. 1).[15]

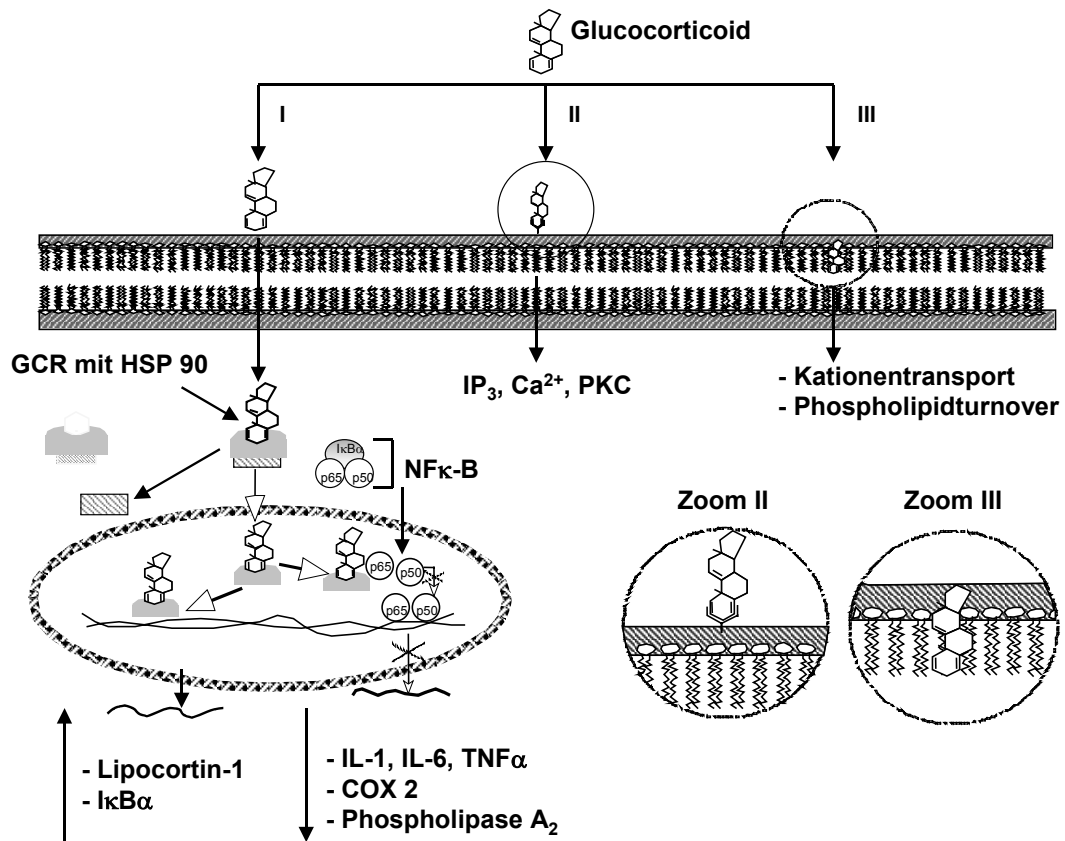


Abb. 1: Genomische (I), spezifische nicht-genomische (II) und unspezifische nicht-genomische Wirkmechanismen (III) der Glucocorticoide; aus: Buttgeriet et al., Arthritis Rheum (1998). HSP = heat-shock protein; IP₃ = Inositoltrisphosphat; PKC = Proteinkinase C; NF-κB = nuclear factor κB; IL = Interleukin; TNF = Tumornekrosefaktor; COX = Cyclooxygenase

Mit steigender Dosis werden zunächst mehr zytosolische Rezeptoren besetzt, wodurch die genomische Wirkung zunimmt. Ab einer Dosis von 200 bis 300 mg Prednisolonäquivalent pro Tag sind jedoch beim Erwachsenen rechnerisch alle Rezeptoren abgesättigt (7,5 mg entspricht einer Sättigung von 42 %, 15 mg einer Sättigung von 63 % aller Rezeptoren).[16]

Darüber hinaus gehende Dosierungen müssen ihre Wirkung folglich über andere Mechanismen vermitteln.

Ein weiteres wichtiges Argument für die Existenz anderer Wirkmechanismen ist die Dauer von der Verabreichung des Medikaments bis zum Wirkungseintritt. Bis zum Eintritt der genomischen Wirkungen dauert es in der Regel mindestens 30 Minuten. Zu den frühesten berichteten genomischen Effekten gehört der Anstieg der Transkriptionsrate von transfizierten Mamma-Tumorzellen (L tk-aprt Zellen) der Maus 7,5 Minuten nach Glucocorticoidapplikation.[17] Schnellere Wirkungen, wie sie gerade bei hohen Dosierungen in der Notfallbehandlung von anaphylaktischem Schock oder bei neurologischen Traumata zu beobachten sind, werden nach heutigen Erkenntnissen über die nicht-genomischen Wirkmechanismen vermittelt. Diese Annahme wird

noch dadurch bestärkt, dass diese Effekte nicht durch Inhibitoren der Transkription (z.B. Actinomycin D) oder Translation (z.B. Cycloheximid) beeinflusst werden. Man geht heute davon aus, dass der Beginn der Wirkung bei spezifischen nicht-genomischen Wirkungen im Bereich von Sekunden bis wenige Minuten, bei unspezifischen nicht-genomischen Wirkung im Bereich von wenigen Sekunden liegt.[15, 18]

Zu den zwei oben genannten nicht-genomischen Wirkmechanismen wird neuerdings noch ein weiterer in Erwägung gezogen, der über den zytosolischen GCR wirken soll.[19] Schmidt et al. postulierten, dass nicht-genomische Wirkungen die genomischen Glucocorticoid-Effekte komplementieren könnten durch schnelle Veränderung der intrazellulären Signalsysteme und nachfolgend des intrazellulären Ionenmilieus.[20] Hierdurch könnten neben dem Ansprechen von distinkten Effektormolekülen auch die genomischen Transkriptionsprozesse moduliert werden. Anhalt für nicht-genomische Effekte von Steroiden gibt es schon seit 60 Jahren. Hans Selye beschrieb damals den anästhetischen Effekt von Progesteron kurz nach Applikation.[21] 1974 wurden direkte Membraneffekte von Glucocorticoiden auf isolierte Synaptosomen gezeigt.[22] Sie wurden angesehen als das Gegenstück für den lange bekannten negativen Feedback-Mechanismus zwischen Plasma-Cortisol und ACTH, der binnen weniger Minuten eintritt. Erst im letzten Jahrzehnt wurde dann die Forschung auf dem Gebiet der nicht-genomischen Glucocorticoidwirkungen erfolgreich intensiviert. Kürzlich erschienene Reviews von Schmidt et al., Buttgeriet et al. sowie Sutter-Dub zeigen den Umfang der aktuellen Forschung auf diesem Thema.[18, 20, 23]

Genomische Wirkmechanismen (I)

Die genomischen Wirkmechanismen mit ihren Effekten sind sehr gut untersucht und weitgehend bekannt.[24] Die lipophilen Steroidmoleküle diffundieren durch die Zellmembran und binden intrazellulär an im Zytosol befindliche Glucocorticoidrezeptoren (cGCR). Die Struktur dieses Proteins ist in Abb. 2 dargestellt.

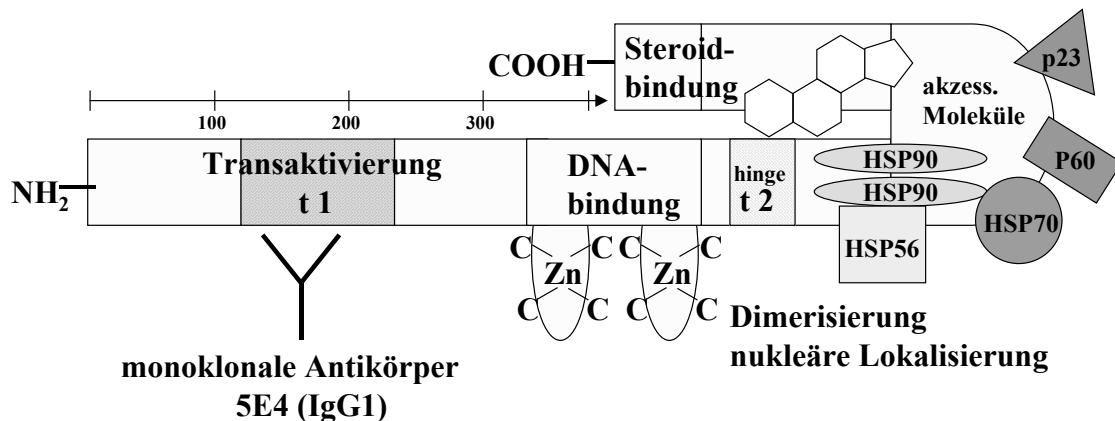


Abb. 2: Schematische Darstellung des Glucocorticoidrezeptors. Der von uns zur Detektion benutzte monoklonale Antikörper ist gegen eine konservierte Sequenz (150 – 176 Aminosäuren) vom Regulationsteil des Rezeptors gerichtet. Berki et al. (1998), J Immunol Methods

Der Rezeptor existiert in zwei unterschiedlichen Isoformen *GCRα* und *GCRβ*. *GCRα* vermittelt die klassischen Hormoneffekte, während *GCRβ* unfähig zur Hormonbindung ist und als Antagonist zu *GCRα* wirkt.[25] Im ungebundenen Stadium ist der *GCRα* u.a. an *Hitzeschockproteine* (HSP) gebunden, die die Wirkung des Rezeptors auf die DNA blockieren und bei Bindung des Steroids an den Rezeptor abgespalten werden. Die HSP sind Teil eines Multi-Protein-Komplexes, der unter anderem auch den *Steroid receptor activator* (Src) enthält, dessen Funktion noch diskutiert wird (s.u.). Bei Ligandenbindung dissoziieren cGCR und kleine Moleküle (u.a. Src) von den HSP ab. Der nun aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex gelangt in den Zellkern, wo er an spezifische DNA-Orte bindet. Hierdurch wird die Transkription von Genen initiiert beziehungsweise inhibiert (Abb. 1). Neben der direkten Bindung des aktivierten Hormon-Rezeptor-Komplexes an spezifische DNA-Abschnitte ist die Interaktion zwischen aktiviertem *GCRα* und den Transkriptionsfaktoren *Activating Protein 1* (AP-1) und *Nuclear factor kappa B* (NF-κB) bekannt. Diese Faktoren steuern die Transkription bestimmter Gene. Durch verminderte Aktivierung, wirksame Modifizierung bzw. durch eine Hemmung der Transkriptionsfaktoren werden demnach weniger inflammatorische Proteine gebildet (sogenannte Transrepression).[26, 27, 28] Allerdings scheinen diese Effekte erst bei höheren Dosierungen aufzutreten, weshalb man den Einfluss nicht-genomischer Wirkmechanismen in Erwägung ziehen muss.[29] Adcock bezeichnet die Inhibition der Transkriptionsfaktoren durch aktivierte GCR ohnehin als nicht-genomische Effekte.[26]

Ein wichtiges Protein, dessen Translation initiiert wird, ist das *Lipocortin 1* (LC1). Dieses inhibiert die Phospholipase A₂. Dadurch werden über die Arachidonsäurekaskade weniger Entzündungsmediatoren gebildet. Glucocorticoide hemmen auch die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-6 (IL-6).

Spezifische nicht-genomische WM (II)

Der schnelle Wirkungseintritt und die Unempfindlichkeit gegenüber Transkriptionsinhibitoren sind die wichtigsten Argumente, einen Glucocorticoideffekt als nicht-genomisch zu bezeichnen.[15, 20] Nach Buttgereit et al. werden diese Effekte als spezifische nicht-genomische Wirkungen bezeichnet, wenn sie bei niedrigen Dosierungen nachzuweisen sind und ein spezifischer Wirkmechanismus über definierte Rezeptoren vermutet wird bzw. bekannt ist.[15] Derartige Effekte mit Auswirkungen auf verschiedene Second Messenger Systeme (IP₃, Ca²⁺, cAMP, PKC) (Abb. 1) wurden für das Mineralocorticoid Aldosteron bei nicht-epithelialen Zellen, menschlichen Lymphozyten und glatten Muskelzellen gefunden.[30, 31, 32] Auch für weitere Steroidhormone wie Testosteron und Östrogen wurden mittlerweile nicht-genomische Wirkungen über membranständige Rezeptoren beschrieben.[33, 34, 35, 36, 37, 38] Der direkte Beweis, dass diese Wirkungen durch spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran bedingt sind, wurde bislang noch nicht erbracht. Für die Existenz der membranständigen Glucocorticoidrezeptoren gibt es allerdings schon länger Hinweise. Sie wurden auf Nervenzellen von Amphibien,[39, 40] auf Maus-Lymphomzellen[41, 42] und auf humanen Leukämiezellen[43, 44] nachgewiesen. Darüber hinaus gibt es mittlerweile eine Veröffentlichung über die physiologische Existenz von mGCR auf humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.[45] Die Existenz sowie die Umstände der Expression von mGCR auf humanen PBMC ist auch Thema der vorliegenden Arbeit.

Inwiefern membrangebundene und zytosolische GCR miteinander verwandt sind, ist umstritten. Evans et al. gingen kürzlich eher von zwei unterschiedlichen Proteinen aus.[46] Sie argumentieren vor allem mit der unterschiedlichen Molekülmasse der beiden Proteine (96 kDa für den zytosolischen, 63 kDa für den membranständigen GCR). Die Tatsache, dass sich mGCR mit monoklonalen Antikörpern gegen zytosolische GCR spezifisch detektieren lassen[43, 44, 45] (s.u.), weist dagegen auf eine Verwandtschaft hin. Eine Hypothese wäre hierfür, dass die Transkripte des entsprechenden DNA-Abschnittes für den GCR unterschiedlich gespliced werden.[41] Bei den membranständigen Rezeptoren für Östrogene wird eine ähnliche Diskussion geführt. Auch hier sind die Herkunft des membranständigen Rezeptors sowie seine Struktur unklar. Seine Exis-

tenz ist akzeptiert. Es wird jedoch diskutiert, inwiefern er mit dem zytosolischen Rezeptor verwandt oder aber ein vollkommen anderes Molekül ist.[47]

Unspezifische nicht-genomische WM (III)

Bei diesen WM werden unspezifische physikochemische Wechselwirkungen der Steroidmoleküle mit den Zell- und Mitochondrialmembranen angenommen. Diese Wirkungen treten erst bei sehr hohen Dosen auf und werden vermutlich durch Interkalierung der Moleküle in den biologischen Membranen verursacht. Hierdurch kommt es zu einer Änderung der physikochemischen Membraneigenschaften sowie der Aktivität membranassoziierter Proteine. In Con A-stimulierten Lymphozyten wurde eine Einschränkung der Zellatmung sowie der transmembranösen Transporte von Kalzium und Natrium durch hohe Dosen von Methylprednisolon festgestellt, während die Proteinsynthese kaum beeinflusst wurde.[48, 49] Dies wird durch direkte Effekte verursacht und nicht durch eine verminderte ATP-Produktion.[50] Die ATP-Verfügbarkeit wird dennoch verringert durch Inhibition der Reaktionen der Substratoxidation und der Erhöhung des mitochondrialen Protonenleaks. *In vitro* traten diese Effekte bei Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-4} mol/l auf. Diese Dosen können *in vivo* bei intravenöser Hochdosis-Stoßtherapie bzw. bei intraartikulären Injektionen erreicht werden. Die Beeinflussung des zellulären Energiemetabolismus wird als wichtiger Mechanismus für die antiinflammatorischen Effekte der Glucocorticoide angesehen.[18, 51] Dabei scheint sich die relative Wirkpotenz der Glucocorticoide hinsichtlich der genomischen und nicht-genomischen Wirkmechanismen zu unterscheiden. Auf Rattenthymozyten und humanen PBMC wurde der schnelle Einfluss verschiedener Glucocorticoide auf zellulären O_2 -Verbrauch, Proteinsynthese sowie Na^+K^+ - und Ca^{2+} -ATPase untersucht.[48, 52] Die verwendeten Substanzen konnten in unterschiedlichen Dosierungen die gleichen inhibitorischen Effekte auf die Zellatmung und ATP-verbrauchende Prozesse erzielen. Entsprechend der verwendeten Dosierung wurde die relative Wirkpotenz ermittelt. Dabei ergab sich, dass Dexamethason eine um 50 % stärkere Potenz als Methylprednisolon aufweist, Prednisolon aber nur über ca. 1/3 der Wirkpotenz von MP verfügt. Im Vergleich dazu die relativen genomischen Potenzen: Dexamethason: 30, Methylprednisolon: 5, Prednisolon: 4, Hydrocortison: 1.

Schnelle Effekte infolge der GC-cGCR-Bindung

Croxtall et al. fanden kürzlich, dass unter anderem die Dexamethason-abhängige Phosphorylierung von Lipocortin 1 (LC1) bereits nach fünf Minuten nachweisbar ist, und dieser Effekt über zytosolische Glucocorticoidrezeptoren vermittelt ist.[19] Er war durch RU486, nicht aber durch Actinomycin blockierbar. Die Autoren vermuteten einen Wirkmechanismus, der durch Kinasen

im Multi-Protein-Komplex vermittelt ist. Dieser ist wie der cGCR an das Hitzeschockprotein gebunden. Offensichtlich sind die Freisetzungen von GCR und Src zwei verschiedene Prozesse, da die Aktivierung von LC1 auch ohne die Translokation des GCR zum Zellkern stattfindet. Durch Blockade der Kinasen, zu deren Gruppe Src gehört, ließ sich diese schnelle Aktivierung verhindern. Es scheint demnach, dass Src eine Rolle bei dieser schnellen Glucocorticoidwirkung spielt. Hafezi-Moghadam et al. berichteten über schnell einsetzende kardiovaskuläre Effekte bei bereits geringen Dosen von Dexamethason (100nM). Hier gingen die Autoren von einer nicht-transkriptionellen Aktivierung der endothelialen NO-Synthase nach Bindung des GC an den cGCR aus.[53]

1.2 Glucocorticoidwirkungen und Osteoporose

Glucocorticoide haben vielfältige Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel. Eine regelmäßige Einnahme von Glucocorticoiden befördert die Entstehung einer Osteoporose. Die Schwellendosis für die Entstehung dieser Krankheit ist dabei umstritten. Meist wurde sie bisher mit 7,5 mg Prednisolonäquivalent / Tag angegeben. Es gibt jedoch Hinweise, dass bei Langzeittherapie auch niedrigere Dosen Osteoporose induzieren können (s.o.).[13, 14, 54] Es ist auffallend, dass sich diese Nebenwirkung der Glucocorticoide bei verschiedenen Patienten sehr unterschiedlich schnell entwickelt. Hier spielen individuelle Faktoren wie Hormonhaushalt, Ernährung, Bewegung, familiäre Belastung sowie die Art und die entzündliche Aktivität der Grundkrankheit eine wichtige Rolle.[55, 56, 57]

Innerhalb des ersten halben Jahres nach Beginn der Therapie ist der größte Knochendichteverlust durch gesteigerten Knochenabbau und verminderten Knochenaufbau zu erwarten.[54, 58] Allerdings wird in der alltäglichen Praxis nicht immer eine initiale Knochendichtemessung (vor Therapiebeginn) vorgenommen.

Der Knochendichteverlust wird in allen Skelettregionen beobachtet und führt zu einem erhöhten Frakturrisiko. Besonders ausgeprägt ist er allerdings im Stammskelett, d.h. in der Wirbelsäule und der Hüfte. Die Spongiosa ist dabei stärker betroffen als die Kompakta.[59]

An der Entstehung sind mehrere Mechanismen beteiligt. Durch verminderte Calcium-Resorption im Magen-Darm-Trakt sowie eine tubuläre Hyperkalziurie entsteht eine negative Calciumbilanz. Auch ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, verursacht durch die Hyperkalziurie, ruft wahrscheinlich einen erhöhten Knochenumsatz hervor, wobei dies zuletzt wieder in Zweifel gezogen wurde.[59]

Durch die Suppression von ACTH besitzen Glucocorticoide zudem einen katabolen Effekt.

Durch direkte Hemmung der Gonadotropine sowie die verminderte ACTH-Sekretion kommt es

zur Verminderung der Konzentration von Androgenen und anderen Sexualhormonen.[59] Auf zellulärer Ebene findet eine Down-Regulation der Vitamin-D-Rezeptoren statt. Daraus resultiert ein vermindertes Ansprechen auf Vitamin D. Ebenfalls auf zellulärer Ebene können Glucocorticoide rezeptorvermittelt die Aktivität der Osteoblasten vermindern, ohne die Osteoblastenzahl zu beeinflussen.

Glucocorticoide führen darüber hinaus zu einer Hemmung verschiedener Zytokine wie Insulin-like growth factor-1, Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor sowie anderer Wachstumsfaktoren, die unter anderem auch am Knochenstoffwechsel beteiligt sind. Es wird auch diskutiert, ob nicht-genomische Glucocorticoid-Effekte an der Entstehung der Osteoporose beteiligt sind. Hierbei wird eine verstärkte Apoptose von Knochenzellen angenommen, die über membranständige Glucocorticoidrezeptoren vermittelt sein könnte.[60]

1.3 Zielsetzung

In dieser Dissertation sollten zum einen anhand von erfassten Daten über die Wirkungen und Nebenwirkungen von Glucocorticoiden, im Speziellen von Methylprednisolon, Vor- und Nachteile dieser Medikamentengruppe gegeneinander abgewogen werden. Zum anderen sollte ein Beitrag zur weiteren Aufklärung ihrer Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene geleistet werden.

Die Dissertation gliedert sich daher in zwei Teile:

1. Der erste Teil ist eine klinische Studie über die Wirkungen und Nebenwirkungen einer Langzeit-Low-Dose-Glucocorticoidtherapie bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.

Hierbei wurden unterschiedliche Nebenwirkungen registriert, die typisch für die Dauerbehandlung mit Glucocorticoiden sind. Dazu gehören zum Beispiel der verstärkte Knochenabbau, die Hautveränderungen oder die Cushing-Symptomatik. Andererseits sollten die Patienten Fragebögen bezüglich ihrer Lebensqualität ausfüllen, um eine Aussage über den Nutzen dieser Substanzgruppe zu bekommen. Dabei wurde bewusst nur ein GC-Präparat verwendet, um mögliche Unterschiede zwischen den Glucocorticoiden auszuschließen, die nicht mit der herkömmlichen relativen Wirkpotenz (bzw. den sog. Äquivalenzdosen) zu erfassen sind. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: Wie ausgeprägt sind die Nebenwirkungen bei einer niedrig-dosierten Langzeitbehandlung mit Glucocorticoiden? Wie ist das Wirkungs-Nebenwirkungsprofil in Abhängigkeit von der Dosierung? Gibt es Unterschiede bzgl. der Ausprägung unerwünschter Wirkungen innerhalb der niedrig-dosierten GC-Therapie? Ist es damit sinn-

voll, die Dosis möglichst weit zu reduzieren mit dem Risiko einer Exazerbation der Grundkrankheit?

2. Der zweite ist ein experimenteller Teil, in dem die Existenz sowie die Funktion membranständiger Glucocorticoidrezeptoren auf einer menschlichen Leukämie-Zelllinie sowie auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) näher untersucht werden soll.

Hierbei sollte vor allem der Frage nachgegangen werden, unter welchen Bedingungen welche Zellen des peripheren Blutes mGCR exprimieren. Von der Beantwortung dieser Frage lassen sich Rückschlüsse auf die Funktionsweise der Rezeptoren erwarten, die für die Aufklärung der Wirkmechanismen der Glucocorticoide von Bedeutung sein könnten. Eine über mGCR vermittelte Wirkung kann zudem nur dort stattfinden, wo auch diese Rezeptoren exprimiert werden. Eine Analyse der Rezeptorexpression könnte daher hilfreich bei Entscheidungen zur Glucocorticoidtherapie für den jeweiligen Patienten sein.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungen zu Wirkungen, Nebenwirkungen und Lebensqualität bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unter low-dose Glucocorticoidtherapie am Beispiel von Methylprednisolon

2.1.1 Patienten

Für diese Untersuchungen wurden die Patienten aus der Osteoporosesprechstunde der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité rekrutiert. Es wurden Patienten mit entzündlich-rheumatischen Krankheiten eingeschlossen, die eine niedrig-dosierte Methylprednisolontherapie über mindestens ein Jahr bekamen. Wir beschränkten uns auf die Untersuchung nur eines Glucocorticoidpräparats, um sehr exakt Dosierungen vergleichen zu können. Grund dafür ist die Tatsache, dass unterschiedliche Glucocorticoidpräparate eine unterschiedliche Wirkpotenz haben und durch die nur unscharf definierten „Äquivalenzdosen“ ein exakter Vergleich nicht möglich ist (s. Kap. 1.1.).[51, 61]

2.1.2 Erfassung der Patientendaten

In der Osteoporosesprechstunde werden routinemäßig folgende Parameter erhoben:

- Ergebnisse der Jetztanamnese und der aktuellen klinischen Untersuchung
- Laborchemische Untersuchungsbefunde (siehe Kapitel 2.1.5.)
- Ergebnisse der Osteodensitometrie mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) (siehe Kapitel 2.1.4.)

Bei jedem der eingeschlossenen Patienten wurden in der Sprechstunde folgende Daten dokumentiert:

- Persönliche Daten (vertrauliche Behandlung)
- Diagnose
- Daten zur Therapie der rheumatischen Erkrankung
 - Daten zur Therapie mit Methylprednisolon
 - Basistherapeutika, Immunsuppressiva, NSAR, Analgetika, Osteoporosetherapeutika
- Begleiterkrankungen und entsprechende Medikation
- Frakturen in den letzten 12 Monaten

- Laboruntersuchungen (siehe oben)
- Daten zur Beschreibung der klinischen Situation des Patienten:
 - klinische Untersuchung der Wirbelsäule
 - Erfassung klinischer Nebenwirkungen

Zusätzlich zu diesen Routineparametern wurden für die Studie folgende Daten erfasst:

- dokumentiert durch den Arzt:
 - Visuelle Analogskala (VAS) zur globalen Krankheitsaktivität
- dokumentiert durch den Patienten:
 - VAS zur globalen Krankheitsaktivität
 - VAS zu den Gelenkschmerzen
 - VAS zu den Schmerzen durch Osteoporose
 - VAS zur Müdigkeit
 - VAS zum allgemeinen Gesundheitszustand
 - Short Form-36-Fragebogen

Bei den visuellen Analogskalen muss der Arzt oder Patient auf einer 10 cm langen Linie mit entgegengesetzten Endpunkten (z.B. starke Schmerzen – keine Schmerzen) einen Punkt auf der Linie markieren, der ihrer subjektiven Einschätzung am ehesten entspricht. Die markierte Stelle wird ausgemessen, der Wert in Millimetern angegeben.

In der Regel konnten alle Parameter problemlos erhoben werden, die Patienten waren durchweg interessiert und sehr kooperativ. Die primäre Erfassung der Daten erfolgte in Papierform. Nachfolgend wurden sie computerunterstützt verwaltet und statistisch ausgewertet (MS Excel, SPSS). Die Daten zu Diagnose, Therapieschema sowie Dauer und Art der Therapie wurden aus den Krankenakten sowie aus der Eigenanamnese ermittelt. Zu der Bewertung der Nebenwirkungen zählten neben der Messung der Knochendichte die Patientenbefragung sowie die klinische Untersuchung. Von Belang waren hierbei osteoporosebedingte Schmerzzustände, Cushing-Symptomatik, Hautveränderungen in Form von Unterblutungen, Verdünnung der Haut sowie Ausbildung von Striae. Außerdem wurden die Patienten nach bekannten Erhöhungen des Augeninnendrucks befragt, die vom Ophthalmologen diagnostiziert worden waren.

2.1.3 Fragebogen zum Gesundheitszustand

Zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes verwendeten wir einen Standardfragebogen, den Short Form-36 (SF-36). Diesen bekamen die Patienten am Ende der Untersuchung ausgehändigt mit der Bitte, ihn möglichst vollständig und exakt auszufüllen.

2.1.4 Bestimmung der Knochendichte

Die Knochendichte wurde mit einem DEXA-Gerät gemessen. DEXA bedeutet Dual Energy X-Ray Absorptiometry. Dieses Verfahren ermöglicht eine quantitative Messung des Knochenmineralgehaltes von einzelnen Regionen des Körpers. Der menschliche Körper kann in guter Näherung in zwei verschiedene Komponenten unterteilt werden, das Knochengewebe und das Weichteilgewebe. Setzt man dieses Zwei-Komponenten-System voraus, sind Photonenstrahlen mit zwei unterschiedlichen Energien notwendig, um aus den jeweiligen Schwächungen der Ausgangsintensitäten die Massen der zwei unterschiedlichen Materialien zu berechnen. Diese Materialien – und damit deren Dichte – werden als bekannt vorausgesetzt, während die Masse den berechneten Wert darstellt. Dadurch werden Messfehler minimiert, die auf der ungleichmäßigen Verteilung des Weichteilgewebes und den nicht konstanten Körperkonturen (Konstitution, Gewicht) beruhen. Theoretisch wird für die Dichteanalyse einer gegebenen Anzahl von Substanzen die gleiche Zahl an Absorptionsmessungen mit unterschiedlichen Photonenenergien benötigt. Klinisch ist die Einteilung in zwei Komponenten ausreichend. Die Photonenenergien der verwendeten Photonenstrahlen betragen 38 und 70 keV.

Gemessen wird der Knochenmineralgehalt an verschiedenen Regions of interest (ROI), in unserem Fall an der Lendenwirbelsäule (L2-L4) im anterior-posterioren Strahlengang, sowie am Schenkelhals des Femurs. Die Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD) gibt die Dichte in Bezug auf die Flächenprojektion der ausgewählten Region an und hat somit die Einheit g/cm^2 . Der BMD-Wert wird bis dato als klinisch am besten mit dem Zustand des Skelettsystems eines Patienten korrelierend angesehen.[62] Dieser Wert wird verglichen mit einem existierenden Durchschnittswert junger, gesunder Erwachsener zwischen 20 und 40 Jahren, die von gleichem Geschlecht und gleicher ethnischer Herkunft sind. Unabhängig vom Alter steigt bei sinkendem BMD-Wert das Risiko für Frakturen. Mit etwa jeder Standardabweichung (SD) zu niedrigeren Werten verdoppelt sich dieses Risiko.[63, 64] Nach der WHO-Übereinkunft wird ab einer Abweichung von 1,0 SD nach unten von Osteopenie, ab 2,5 SD von Osteoporose gesprochen.[65, 66] Ab diesem Wert steigt das Risiko für Spontanfrakturen rapide an.[63] Diese Richtwerte übernahmen wir auch zur Interpretation unserer Ergebnisse. Allerdings spielen auch andere Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Familienanamnese, vorausgegangene Frakturen

und erhöhte biochemische Knochenumsatzparameter eine wichtige Rolle.[67] Für die individuelle Beurteilung des Risikos für eine Fraktur wird daher neuerdings die Beurteilung des absoluten Risikos unter Einbeziehung der o.g. Parameter statt des relativen Risikos propagiert.[68, 69] Die Abweichung vom Durchschnittswert junger Erwachsener in x-facher Standardabweichung bezeichnet den T-Score.

2.1.5 Blut- und Urinuntersuchungen

Standardmäßig wurden Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein, kleines Blutbild, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat) sowie einige Leber- und Nierenwerte (Bilirubin, ASAT, ALAT, gammaGT, Kreatinin, Harnstoff) gemessen. Außerdem wurden die Parameter zum Knochenstoffwechsel erhoben. Diese Parameter werden routinemäßig in der Osteoporosesprechstunde unserer Klinik angesetzt. Zu den Parametern für den Knochenstoffwechsel gehören die Ostase, das Osteocalcin, die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Kn-AP) sowie die Cross-links im Urin Pyridinolin, Desoxypyridinolin und N-Telopeptid. Osteocalcin und Kn-AP dienen dabei als Parameter für den *Knochenaufbau*, während die Pyridinum-Crosslinks und die „crosslinked“ Telopectide Aussagen über den *Knochenabbau* erlauben.[70] Man erhofft sich, anhand dieser Parameter Veränderungen im Knochenstoffwechsel frühzeitig erkennen zu können. Der BMD-Wert steht zur Beurteilung eines Knochenabbaus erst am Ende eines Prozesses, der bereits begonnen hat. Erst nach zwei bis drei Jahren unterscheiden sich wiederholte Messwerte der BMD signifikant von Vorwerten aufgrund großer individueller Variabilität und langsamen Ansprechens der Messwerte.[71] Nur in manchen Fällen, wie dem Beginn einer GC-Therapie, findet eine schnellere Änderung der Messwerte statt. Darüber hinaus variiert der BMD-Wert sehr stark, z.B. abhängig vom Alter.[72] Dagegen sind die biochemischen Knochenmarker sensitiv für frühe Änderungen des Knochenumsatzes.[71, 73] Es gibt gegenteilige Meinungen darüber, inwiefern sie eine Veränderung der Knochendichte vorhersagen können.[74, 75] Allerdings sprechen viele Publikationen dafür, dass diese Parameter ebenso wie der BMD-Wert eine Vorhersage über zukünftige Frakturen erlauben.[69, 74, 76, 77, 78, 79, 80] Daher wird die Erhebung der biochemischen Knochenmarker als unabhängiger Vorhersagewert, der komplementär zur Messung der BMD verwendet werden kann, als sinnvoll erachtet.

2.2 Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren

2.2.1 CCRF-CEM- (CCL 119-) Zelllinie

Bei der CCRF-CEM-Zelllinie handelt es sich um periphere T-Lymphoblasten. Sie stammen ursprünglich von einem an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankten 4-jährigen Kind. Diese Tumorzellen wurden in RPMI-1640 Puffermedium mit 5 % BSA bei 5,5 % CO₂ Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur späteren Verwendung sowie zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde die Zellsuspension bei 300 g für 10 min zentrifugiert, mit einer Zelldichte von 2×10^6 / ml resuspendiert, in Aliquots à 5×10^6 Zellen abgefüllt und mit DMSO als Gefrierschutzmittel versetzt. Anschließend wurden die Zellen zunächst für einige Wochen bei –80°C zwischengelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei –156°C endgelagert wurden.

2.2.1.1 Morphologie

Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet, zeigen sich bei der CCRF-CEM-Zellkultur polymorphe Zellen mit großem Kern : Plasma-Verhältnis, gelappten Zellkernen sowie Ausbildung von Mikrovilli (Abb. 3). Mitosen waren sehr häufig zu beobachten (Abb. 4). Die Bilder entsprechen einem aufgetauten Zell-Aliquot nach 40 Stunden Wachstumszeit. Sie sprechen für ein gutes Befinden der Zellkultur.

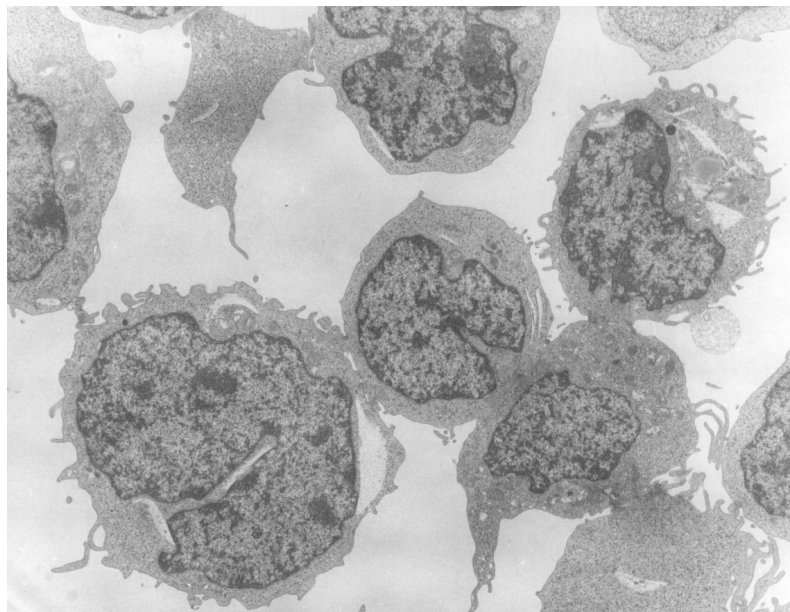


Abb. 3: CCRF-CEM-Zelllinie unter dem Elektronenmikroskop betrachtet

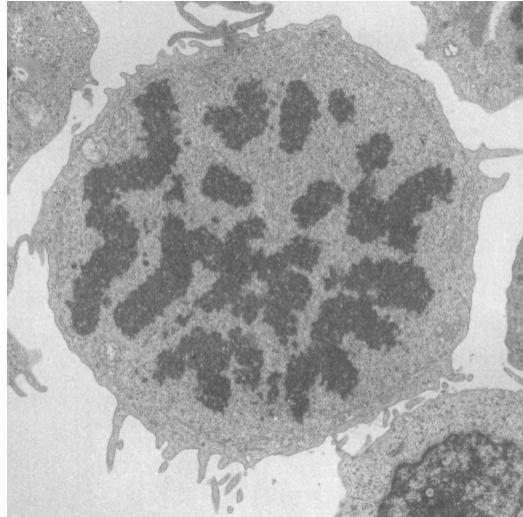


Abb. 4: Eine der zahlreichen Mitosen der CCRF-CEM-Zellen.
Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden uns freundlicherweise von Dr. Axel-M. Ladhoff aus dem Institut für Pathologie der Charité zur Verfügung gestellt.

2.2.1.2 Wachstumskinetik

In Kultur zeigten die CCRF-CEM-Zellen ein exponentielles Wachstum. Ohne Mediumwechsel nahm die Zellzahl nach sieben Tagen wieder ab (Abb. 5).

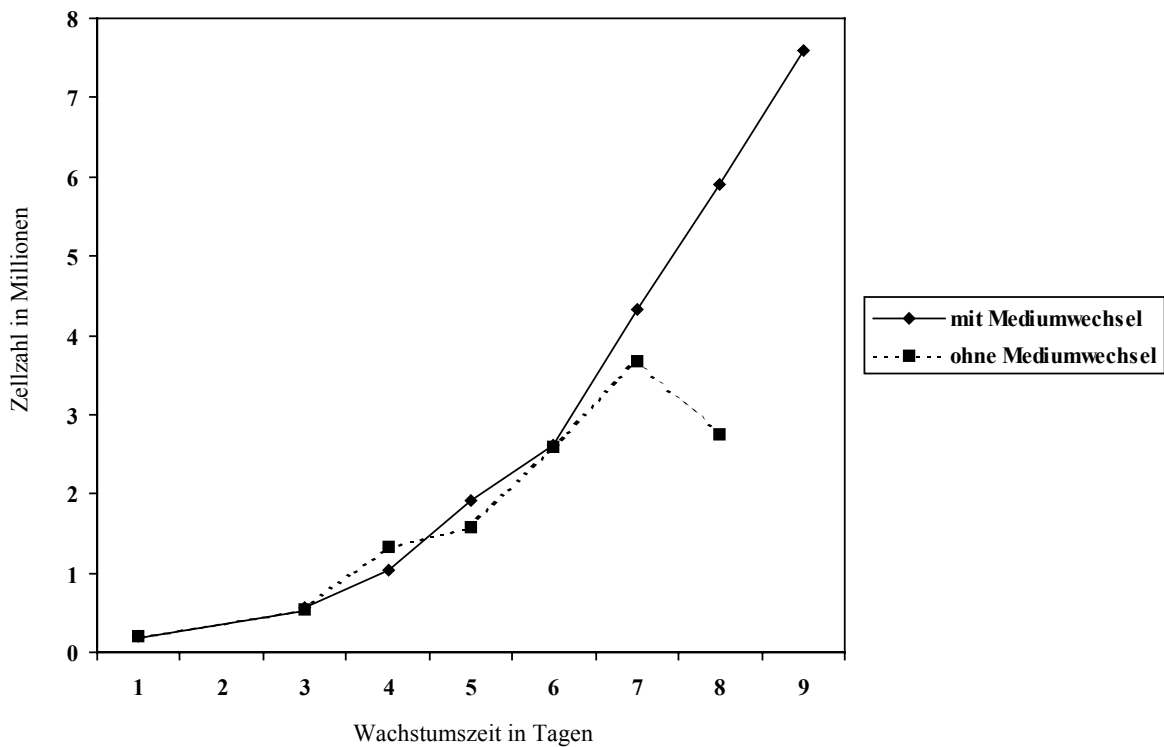


Abb. 5: Wachstumsverhalten der CCRF-CEM-Zellen mit und ohne Austausch des Wachstumsmediums

2.2.2 Präparation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Für die Präparation der PBMC wurden heparinisierte Blutproben verwendet. Das Blut wurde von gesunden Spendern sowie Patienten der Rheumaklinik der Charité nach deren Zustimmung abgenommen. Die Ethikkommission der Charité hatte ebenfalls ihre Zustimmung erklärt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:3 mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung mit Standardzusammensetzung) gemischt und anschließend vorsichtig in einem 50 ml Falcon[®]-Röhrchen auf 15 ml Ficoll geschichtet. Nun erfolgte die Zentrifugation bei 1500 g (2000 U/min) und Zimmertemperatur für 20 Minuten in einer BECKMAN[®] GS-5-Zentrifuge. Die Bremse war dabei ausgeschaltet.

Der Leukozytenring wurde vorsichtig abpipettiert und in PBS/BSA/NaN₃ (PBA) bei 1200 U/min zwei Mal gewaschen. Dafür wurde die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt. Die Zellsuspension wurde von nun an konstant auf Eis gehalten.

Für die Zellzählung wurde ein Aliquot der Zellsuspension zunächst im Verhältnis 1:10 mit PBS, anschließend nochmals 1:5 mit PBS und 3mM Trypanblau verdünnt. Von dieser letzten Verdünnung wurden 10 µl in die mit einem Deckglas versehene Neubauer[®]-Zählkammer gegeben. Es wurden alle vier Quadranten mit ihren je 16 Feldern ausgezählt. Das Trypanblau diente zur Markierung der toten Zellen, die sich aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität blau färben. Ihr Anteil betrug i.d.R. unter 1 %.

2.2.3 Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Verschiedene physikalische und chemische Zelleigenschaften werden simultan auf der Einzelzelebene gemessen. Relative Zellgröße, Granularität sowie bis zu zwölf verschiedene Fluoreszenzfarben können für viele tausend Zellen in kurzer Zeit ermittelt werden. Der Zellsuspension werden Antikörper-Fluorochrom-Konjugate zugesetzt. Die Antikörper sind gegen spezifische Antigene der Zellen gerichtet. Dadurch können beispielsweise Subpopulationen von Zellen (z.B. T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und B-Lymphozyten) unterschieden werden. Monoklonale, fluoreszenzmarkierten Antikörper sind mittlerweile in großer Auswahl kommerziell erhältlich, so dass breite Anwendungsmöglichkeiten sowohl in der Klinik als auch in der Grundlagenforschung bestehen.

Zur Analyse wird die Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen. Die Zellen erreichen so den Analysepunkt, einen Argonlaser

mit 488 nm Wellenlänge, aufgereiht wie an einer Perlenschnur, was als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet wird (Abb. 6).

Das Licht des Lasers wird durch die Zellen gestreut. Die Streuung des Lichtes wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. An Streulicht unterscheidet man den sogenannten „forward scatter“, das Streulicht längs zum Anregungslichtstrahl, und den sogenannten „side scatter“, das Streulicht im rechten Winkel zu dieser Achse. Der forward scatter ist dabei in erster Linie ein Maß für die Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger), während der side scatter vor allem intrazelluläre Granularität misst (Granulozyten streuen mehr als Lymphozyten) (Abb. 6).

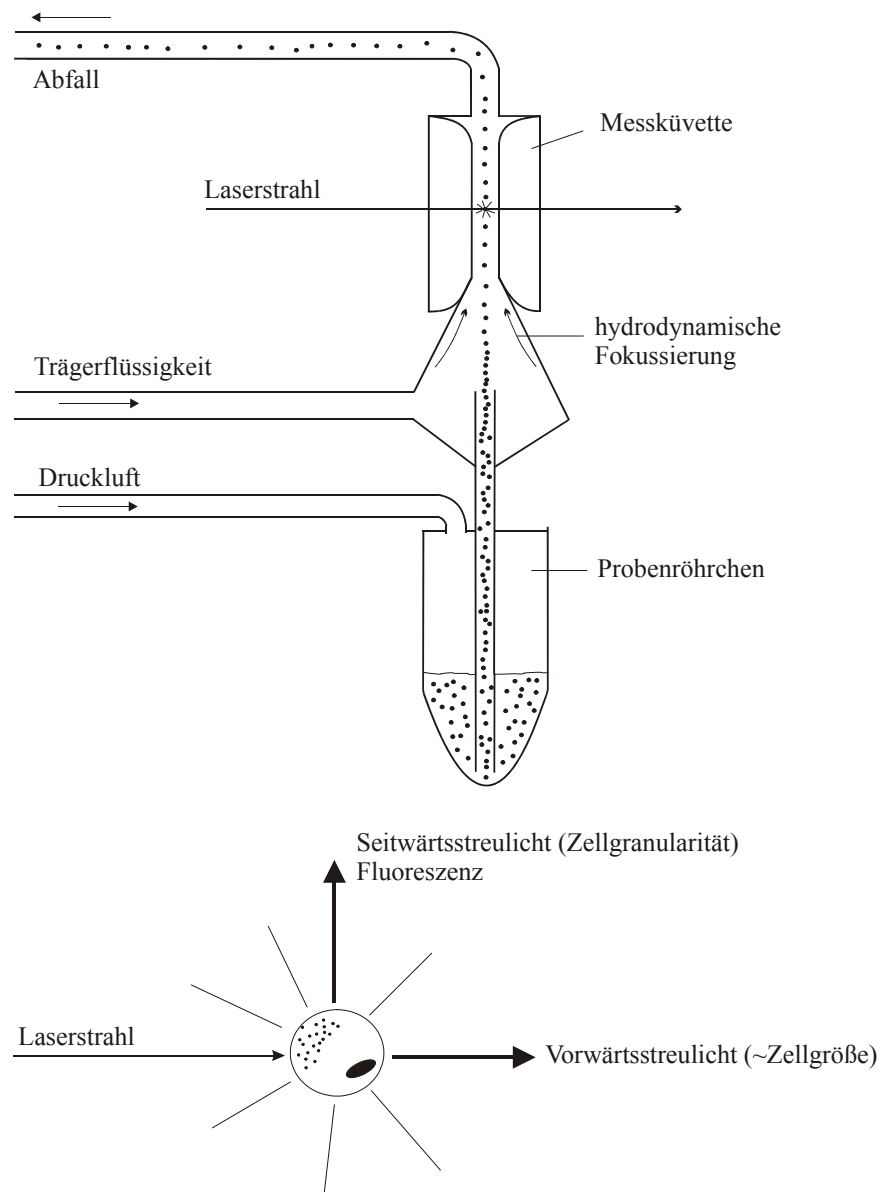


Abb. 6: Oben: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. Unten: Prinzip der Streulicht- und Fluoreszenzmessung

Die Messung der Fluoreszenz (d.h. das Leuchten eines Stoffes durch anregende Strahlung) erfolgt entlang der Laserachse im 90°-Winkel. Die fluoreszierenden Stoffe absorbieren Licht in einem mehr oder weniger breiten Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen der äußeren Schalen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Mit dem Rücksprung auf das ursprüngliche Niveau wird ein Photon abgegeben, es geht Schwingungs-Rotations-Energie verloren. Daher hat das emittierte Licht eine größere Wellenlänge (energieärmer) als das anregende. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe haben unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren. Die Emissionsspektren der Farbstoffe bestimmen nachfolgend die Kombinierbarkeit der Fluorochrome. Sie sollten sich in ihren Wellenlängenbereichen möglichst wenig überschneiden, um sie trennscharf auswerten zu können. Durch Mehrfarbenfluoreszenz wird die Korrelation mehrerer Zelleigenschaften ermöglicht. In Tabelle 1 sind verschiedene Farbstoffe zusammen mit ihren Exzitationsmaxima (der Wellenlänge, bei der sie am besten angeregt werden) und Emissionsmaxima (der Wellenlänge, bei der das meiste Licht emittiert wird) aufgeführt.

Tabelle 1: Exzitations- und Emissionsmaxima unterschiedlicher Fluorochrome

| Farbstoff | Ex_{max}(nm) | Em_{max}(nm) |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fluorescein Isothiocyanat (FITC) | 490 | 530 |
| Cy5 | 650 | 666 |
| Phycoerythrin (PE) | 480, 545, 565 | 575 |
| Peridininchlorophyll-a (PerCP) | 470 | 680 |
| Allophycocyanin (APC) | 650 | 660 |

Ex_{max}: Exzitationsmaximum, Em_{max}: Emissionsmaximum

Das verwendete Durchflusszytometer war ein fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (FACS Calibur™, Becton Dickinson; San Jose, USA).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Detektion von membranständigen und zytosolischen Glucocorticoidrezeptoren verwendet, sowie zur Unterscheidung der einzelnen Subpopulation der PBMC.

2.2.3.2 Testsystem zur Detektion von zytosolischen und membranständigen Glucocorticoidrezeptoren

Zum Nachweis der Glucocorticoidrezeptoren wurden monoklonale Anti-Glucocorticoidrezeptor-Antikörper (*antiGCR-AK*) verwendet, die freundlicherweise von Frau Dr. Berki vom Institut für Immunologie und Biotechnologie der Medizinischen Hochschule von Pécs, Ungarn, zur Verfügung gestellt wurden. Diese Antikörper wurden gegen die zytosolischen Rezeptoren generiert (Abb. 2).[81] Voruntersuchungen zeigten jedoch, dass auch membranständige GCR durch sie

detektiert werden.[45]

Wir verwendeten zunächst Fluoresceinisothycyanat(FITC)-markierte *anti*GCR-AK. Diese Antikörper werden für die konventionelle Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt (Abb. 7).

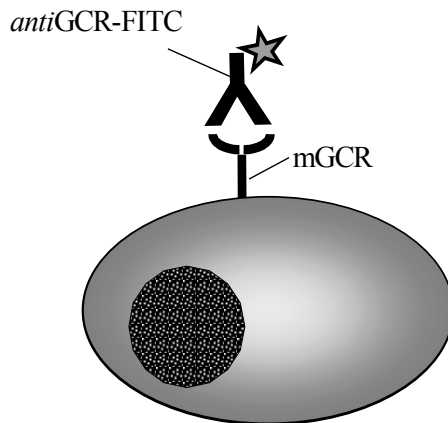


Abb. 7: Konventionelles Immunfluoreszenz-Färbesystem

Zur Verstärkung des Signals setzten wir Sekundärreagenzien ein. Das Besondere an der Detektion der mGCR war die Verwendung einer hochsensitiven Immunfluoreszenz-Färbung mit magnetofluoreszenten Liposomen (siehe Kapitel 2.2.3.4.). Abb. 8 zeigt das bereits in Vorarbeiten angewandte primäre Färbesystem.[45]

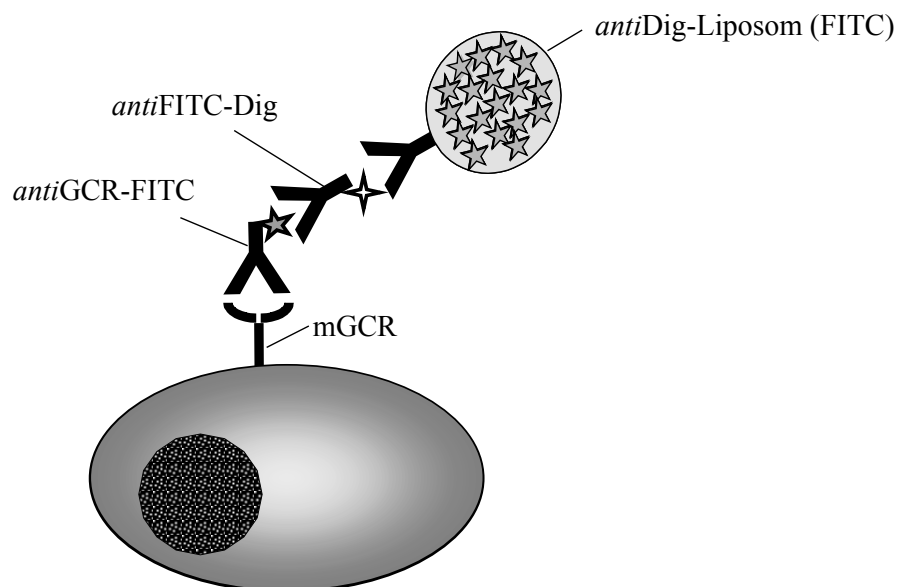


Abb. 8: Primär verwendetes Färbesystem zur Detektion der mGCR: Der *anti*GCR-FITC-Antikörper ist gegen den mGCR gerichtet. Als Sekundärreagenzien zur Steigerung der Signalintensität wurden *anti*FITC-Dig und *anti*Dig-Liposomen verwendet. Die Liposomen enthalten eine Vielzahl von FITC-Molekülen.

Nach Färbung mit den Antikörpern wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Da sich in den ersten Experimenten herausstellte, dass die FITC-konjugierten *antiGCR*-AK eine zu hohe unspezifische Färbung zeigten, stellten wir eine eigene Kopplung der Antikörper mit einem Digoxigenin-succinimidylester her. Dementsprechend stellt sich das optimierte Färbesystem wie in Abb. 9 dar (siehe auch Ergebnisteil, Kapitel 3.2.1.2.).

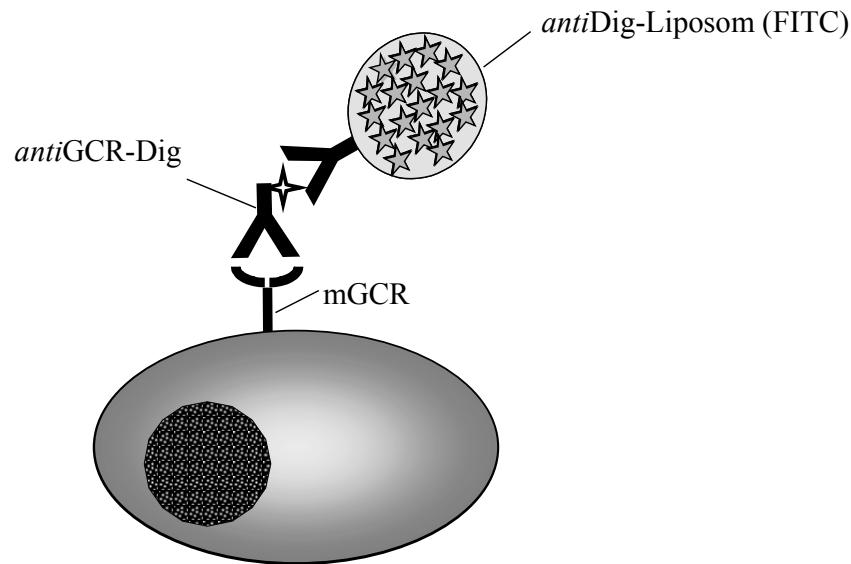


Abb. 9: Optimiertes Färbesystem zur Detektion der mGCR: Der *antiGCR*-Antikörper wurde direkt mit Digoxigenin gekoppelt. Der Zwischenschritt mit Färbung durch *antiFITC*-Dig-Antikörpern entfällt. Die unspezifische Färbung reduzierte sich dadurch.

2.2.3.3 Herstellung des *antiGCR*-Digoxigenin-Konjugats (*antiGCR*-Dig-Konjugat)

Zur Herstellung des *antiGCR*-Dig-Konjugats verwendeten wir die *antiGCR*-AK zusammen mit Digoxigenin-succinimidylester (Dig-SE). Das Antikörperprotein wurde über eine Gelfiltration in den Konjugationspuffer (PBS) überführt, wobei eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt wurde. Dies wurde durch Verdünnung nach Extinktionsmessung bei 280 nm erreicht. Der Dig-SE wurde dann in einer Konzentration von 5 mg/ml in DMSO gelöst. Anschließend wurden die gelösten Ester sofort in die Proteinlösung gegeben. Um das geeignete Molverhältnis zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen der Esterlösung verwendet. Grundsätzlich birgt ein zu geringes Verhältnis (1-2:1) Hapten : Protein die Gefahr, dass das Signal sehr schwach ausfällt. Umgekehrt ist bei hohem Verhältnis ($> 10:1$) das Problem, dass es unspezifische hydrophobe Interaktionen mit den Zellen geben kann bzw. dass das Bindungsreagenz inaktiviert wird oder präzipitiert. Präzipitate lassen sich durch Zentrifugieren bei 12000 g für 10 Minuten entfernen. Für Immunglobuline G geben erfahrungsgemäß Molverhältnisse von 10:1 – 50:1 die besten Resultate. Aus diesem Grund stellten wir drei Ansätze her mit den Molverhältnissen Dig-SE : *an-*

*ti*GCR-AK von 10:1, 30:1 und 50:1. Dafür wurden pro Milliliter Antikörperlösung (Konzentration von 1 mg/ml, Molekulargewicht ca. 150 KD) 44, 132 bzw. 220 µg Dig-SE gelöst in DMSO benötigt.

Nach der Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die freien Haptene per Gel-filtration entfernt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Extinktionsmessung bei 280 nm ermittelt. Danach hatte der Ansatz 10:1 eine Proteinkonzentration von 0,356 mg/ml, der Ansatz 30:1 von 0,351 mg/ml und der Ansatz 50:1 von 0,591 mg/ml.

2.2.3.4 Hochsensitive Immunfluoreszenz mit magnetofluoreszenten Liposomen

Für die Detektion eines Antigens auf der Zelloberfläche mit konventioneller Färbetechnik sind circa 2000 Moleküle/Zelle notwendig.[82, 83, 84] Mit der hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung lässt sich die Signalintensität 100- bis 1000-fach erhöhen, so dass schon bei nur 50 bis 100 Moleküle eine Zelle als positiv im Durchflusszytometer detektiert werden kann.[85] Die magnetofluoreszenten Liposomen (kurz im folgenden: Liposomen) haben eine Größe von 200-300 nm und enthalten mehrere tausend Fluoreszenzmoleküle sowie kolloidale magnetische Partikel, die auch eine magnetische Zellsortierung (MACS) erlauben. In unserem Fall waren die Liposomen mit Fluoresceinisothycyanat (FITC) gefüllt. Die Liposomen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Scheffold im Deutschen Rheumaforschungszentrum zur Verfügung gestellt.

2.2.3.5 Prinzipielles methodisches Vorgehen

Das übliche Vorgehen bestand darin, für jede Probe Messungen mit drei unterschiedlichen Ansätzen vorzunehmen. Der erste Ansatz diente zur Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz – und damit als Referenzwert für die Einteilung in „positive“ und „negative“ Zellen. Hier wurden nur die Sekundärantikörper (*anti*Dig-Liposomen) zugegeben, nicht jedoch die *anti*GCR-Dig-Antikörper. Die Versuchsbedingungen wurden so eingestellt, dass dieser Ansatz eine möglichst geringe Anzahl unspezifisch „positiver“ Zellen aufwies. Dies wurde durch Titrierung der AK erreicht (s. Kap. 3.2.1.3.). Der zweite Ansatz diente der Bestimmung der absoluten Färbung; hier wurden ausschließlich die Färbeantikörper zugesetzt. Mit dem dritten Ansatz wurde die unspezifische Färbung bestimmt, die auch noch nach der Inkubation mit unmarkiertem (d.h. nicht Fluorescein- bzw. Digoxigenin-gekoppeltem) Antikörper (Blockantikörper) im Überschuss vorhanden war. Ausgewertet wurde die „Nettofärbung“, also die Färbung, die sich aus der Differenz von Ansatz zwei und drei ergab. Bei der konventionellen Färbung wurde zu dem Anteil der positiven Zellen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität angegeben. Sie gibt die mittlere Helligkeit aller positiven Zellen an und erlaubt u.a. Rückschlüsse auf die Qualität der Blockade. Bei

der Liposomenfärbung ist sie allerdings nicht aussagekräftig. Sie wurde daher nicht angegeben (siehe dafür: Diskussion, Kap. 4.2.).

Tabelle 2 zeigt die Ansätze in der Übersicht. Die in Zeile 1 aufgeführten polyklonalen IgG dienen der Absättigung unspezifischer Epitope auf der Zelloberfläche, um die unspezifische Färbung nochmals zu reduzieren. Als Inkubationsmedium wurde PBS/BSA/NaN₃ (PBA) verwendet.

Tabelle 2: Reihenfolge der Zugabe der Antikörper in den drei Ansätzen.

| Kontrollansatz | Färbeansatz | Blockansatz |
|---|---|---|
| 1. polyklonale IgG | 1. polyklonale IgG | 1. polyklonale IgG |
| | | 2. unmarkierter <i>anti</i> GCR-AK im Überschuss |
| | 2. <i>anti</i> GCR-Dig-AK | 3. <i>anti</i> GCR-Dig-AK |
| 2. <i>anti</i> Dig-Liposomen (FITC) / <i>anti</i> Dig-Cy5 | 3. <i>anti</i> Dig-Liposomen (FITC) / <i>anti</i> Dig-Cy5 | 4. <i>anti</i> Dig-Liposomen (FITC) / <i>anti</i> Dig-Cy5 |

2.2.3.6 Färbung mit *anti*GCR-Dig-Antikörpern

Oberflächenfärbung

Während der gesamten Färbeprozedur wurde die Zellsuspension auf Eis belassen, um unspezifische Färbeprozesse zu minimieren. Es wurden pro Ansatz zwischen 10⁶ und 5 x 10⁶ Zellen gewaschen und resuspendiert. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Zellen mit humanem polyklonalem Immunglobulin G (Färbekonzentration: 5 mg/ml) für 10 Minuten vorinkubiert. Die Konzentrationen des Färbe- und des Blockantikörpers entsprachen denen des optimalen Färbeergebnisses bei Austitrierung (siehe Ergebnisteil, Kap. 3.2.1.3.). Die Inkubationszeit betrug jeweils 10 Minuten. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal in PBA gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit *anti*Dig-Liposomen.

Intrazelluläre Färbung

Zur Detektion zytosolischer Glucocorticoidrezeptoren müssen die Färbeantikörper in das Zellinnere gelangen. Hierfür muss die Zellmembran permeabilisiert werden. Die Zellen wurden zunächst in 2%iger Formaldehyd-Lösung fixiert (20 Minuten bei Raumtemperatur) und anschließend in PBA gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit 0,5%igem Saponin-Puffer für 20 Minuten. Alle weiteren Inkubations- und Waschschrte wurden ebenfalls in Saponin-Puffer und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die weiteren Färbeschritte entsprachen

bis auf den letzten denen der Oberflächenfärbung. Statt der *antiDig*-Liposomen wurden *antiDig*-Cy5-Antikörper verwendet.

Die Liposomenfärbung ist zur intrazellulären Färbung ungeeignet, weil die Liposomen nicht in die Zelle gelangen und durch Saponin zerstört werden. Zur Detektion der iGCR war außerdem die konventionelle Färbung wegen der hohen Rezeptorenzahl ausreichend (siehe Diskussion, Kap. 4.2.).

2.2.3.7 Optimierung der Färbung durch Sekundärreagenzien

Es wurden Fluoreszenz- und Liposomen-gekoppelte Antikörper gegen Digoxigenin als Sekundärreagenzien verwendet. Diese waren gegen die Digoxigenin-markierten Primär-Antikörper gerichtet.

Liposomenfärbung

Die Verdünnung der *antiDig*-Liposomen betrug 1:200 entsprechend der zuvor erfolgten Austitrierung der Liposomen auf Mauszellen. Vor der Färbung wurden die Liposomen in PBA bei 12000 g zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper abzutrennen. Die Inkubation erfolgte in einem Färbevolumen von 200 µl in einem FACS-Röhrchen für 30 Minuten auf dem Schüttler.

Cy5-Färbung

Der *antiDig*-Cy5-Antikörper wurde in einer Verdünnung entsprechend des besten Ergebnisses bei Austitrierung auf Mauszellen verwendet. Die Inkubationszeit betrug zehn Minuten auf Eis.

2.2.3.8 Detektion der Cluster of Differentiation (CD) 3, 14 und 19

Hierfür verwendeten wir kommerziell erhältliche Antikörper der Firmen Becton Dickinson. Wir verwendeten monoklonale Antikörper gegen CD3, CD14 und CD19. Tabelle 3 zeigt die jeweilige Antikörper-Fluorochrom-Kombination sowie die PBMC-Subpopulationen, die spezifisch die Cluster of Differentiation ausprägen. Nach Austitrierung verwendeten wir ein Verdünnungsverhältnis von 1:50. Die Färbung erfolgte vor der Färbung mit *antiGCR*-Antikörpern. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten.

Tabelle 3: Antikörper-Fluorochrom-Konjugat und Zielzellen, die damit detektiert werden sollen.

| Antikörper | Konjugiertes Fluorochrom | Detektion von |
|------------------|--------------------------|---------------|
| <i>anti</i> CD3 | PerCP | T-Lymphozyten |
| <i>anti</i> CD14 | PE | Monozyten |
| <i>anti</i> CD19 | APC | B-Lymphozyten |

2.3 Bestimmung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Um die Expression der mGCR auf PBMC mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren, bestimmten wir diese anhand der folgenden Parameter:

- Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG)
- C-reaktives Protein (CRP)
- Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke im 28er Score
- Subjektive Einschätzung der Krankheitsaktivität durch Arzt und Patient mittels Visual Analog Scale (VAS). Hierbei wird dem Arzt bzw. dem Patient eine 10 cm lange Linie vorgelegt, deren linkes Ende keine Schmerzen bzw. keine Aktivität etc. repräsentiert, während die rechte Seite größte Schmerzen oder Aktivität darstellt. Der Patient soll die Aktivität seiner Krankheit (VAS 1), die Gelenkschmerzen (VAS 2) sowie den Gesundheitszustand allgemein ohne die Symptome der Grunderkrankung (VAS 3) jeweils zum Zeitpunkt der Untersuchung einschätzen. Die Einschätzung des Arztes bezieht sich auf die globale Krankheitsaktivität (VAS 4) ebenfalls zum Zeitpunkt der Untersuchung. Dieser Einschätzung entsprechend wird ein Punkt auf der 10 cm langen Linie markiert, der „Messwert“ entspricht den gemessenen Millimetern (0 = keine Schmerzen / Aktivität, 100 = größte Schmerzen / Aktivität).
- Disease Activity Score (DAS). Der DAS ist ein Score, der sich aus den Variablen schmerzhaftes und geschwollene Gelenke, BSG sowie dem VAS des Patienten zur Krankheitsaktivität errechnet. F. Salaffi et al. erachten ihn als den spezifischsten und sensitivsten aktuell verfügbaren Parameter für die Einschätzung der Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis und bezeichnen ihn als den „Goldstandard“.[86] Für diesen Wert ergab sich allerdings die geringste Fallzahl, da er nicht errechnet werden kann, sobald einer der vier genannten Parameter fehlt.

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Klinische Studie

Die Patienten wurden in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Methylprednisolondosis innerhalb der letzten zwölf Monate in zwei Gruppen eingeteilt. Die beiden Gruppen wurden hinsichtlich der abgefragten Parameter zu Nebenwirkungen und Lebensqualität untereinander sowie mit den Referenzwerten gesunder Probanden verglichen. Die Grenze zogen wir bei einer durchschnittlichen Dosis von 6 mg. Patienten mit einer Dosis von < 6 mg gehörten zu Gruppe 1, solche mit ≥ 6 mg zu Gruppe 2. Dieser Wert entspricht nach den herkömmlichen relativen Wirkpotenzen einer Äquivalenzdosis von 7,5 mg Prednisolon. Die Grenze wurde hier aus folgenden Gründen gezogen:

- Dieser Wert wurde früher verbreitet als Cushingschwellendosis angesehen (s.o.).
- Diese Dosis wird, wie bereits erwähnt, oft als Schwellendosis für die Entstehung einer steroid-induzierten Osteoporose gewertet. Sie ist jedoch nicht eindeutig definiert. Es gibt Hinweise dafür, dass auch unterhalb von 7,5 mg PÄ/die ein Verlust der Knochensubstanz auftritt.[13, 14, 54] Eindeutige Werte treten ab dieser Schwelle auf.[12] Sie spielt heute auch noch eine Rolle bei einigen Therapie-Empfehlungen zur Behandlung der steroidinduzierten Osteoporose.[7]
- In einer kürzlich erschienen standardisierten Nomenklatur für die Glucocorticoid-Dosierungen wird die Grenze zwischen low-dose und medium-dose GC-Therapie bei 7,5 mg PÄ/die gezogen. Dieser Festlegung zufolge verglichen wir also mit den beiden Dosisgruppen die low-dose mit einer niedrigen medium-dose GC-Therapie.[61]

Zur Auswertung des Vergleichs zwischen den beiden Gruppen wurden eine Vierfeldertafel mit Chi-Quadrat-Test nach Pearson für die bipolaren Parameter (ja/nein-Fragen), sowie der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test für die (nicht normal verteilten) übrigen Werte verwendet. P-Werte $< 0,05$ zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen an. Bei Werten $< 0,1$ sprechen wir von einer Tendenz. Für die Parameter „Knochendichte“ und „durchschnittliche Methylprednisolon-Dosis in den vergangenen 12 Monaten“ wurde zudem der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

2.4.2 Durchflusszytometrische Experimente

Wir korrelierten die Ausprägung der mGCR auf PBMC mit unterschiedlichen Krankheitsaktivitätsparametern. Zu Anschauungszwecken wurden in den Diagrammen jeweils eine Regressions-

gerade ermittelt. Schließlich wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman sowie die p-Werte für das Kriterium eines statistisch signifikanten Zusammenhangs berechnet. Ein p-Wert von $< 0,05$ bedeutetet einen signifikanten Zusammenhang.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Studie

3.1.1 Charakterisierung der Patienten und der Vergleichsgruppen

Es wurden 42 Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung und Methylprednisolontherapie für mindestens ein Jahr in die Studie aufgenommen. Diese wurden entsprechend ihrer durchschnittlichen Dosis an Methylprednisolon innerhalb der vergangenen 12 Monate in zwei Gruppen unterteilt. Die maximale Dosierung innerhalb des vergangenen Jahres betrug in keinem Fall mehr als 16 mg/die (zu den Kriterien für die Einteilung in die beiden Dosisgruppen siehe Kapitel 2.4.1.). Aus Tabelle 4 ergibt sich die Verteilung des Alters, des Geschlechts, der Diagnosen sowie der Therapiedauer in den beiden Vergleichsgruppen:

Tabelle 4: Überblick über die Patienten in den beiden Dosisvergleichsgruppen

| | Gruppe 1 untere Dosishöhe (< 6 mg) | Gruppe 2 obere Dosishöhe (≥ 6 mg) |
|---|---|--|
| Anzahl (n) | 21 | 21 |
| weiblich | 19 | 16 |
| männlich | 2 | 5 |
| Alter | 20-80 | 24-79 |
| Durchschnitt | 53,81 | 50,24 |
| Diagnosen | 1) Kollagenosen: 7 2) Vaskulitiden: 4 3) Rheumatoide Arthritis: 7 4) Spondylarthropathien: 1 5) Andere: 2 | 1) Kollagenosen: 10 2) Vaskulitiden: 6 3) Rheumatoide Arthritis: 3 4) Spondylarthropathien: 1 5) Andere: 1 |
| Methylprednisolondosis in den vorausgegangenen 12 Monaten | Mittelwert: 4,11 mg Median: 4 mg Minimum: 1,58 Maximum: 5,83 mg | Mittelwert: 9,04 mg Median: 8,2 mg Minimum: 6 mg Maximum: 15 mg |
| Therapiedauer | Mittelwert: 6,89 Jahre Median: 4 Jahre Minimal: 2 Jahre Maximal: 20 Jahre | Mittelwert: 7,06 Jahre Median: 6 Jahre Minimal: 1 Jahre Maximal: 22 Jahre |

- 1) Systemischer und kutaner Lupus erythematoses, Polymyositis, CREST-Syndrom, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie
- 2) M. Wegener, Polymyalgia rheumatica, Churg-Strauss-Vaskulitis, sonstige Vaskulitiden
- 3) Diagnose nach ARA-Kriterien
- 4) Spondylitis ankylosans und seronegative Spondylarthropathie
- 5) Polychondritis, Cogan-Syndrom, Still-Syndrom

Tabelle 5 zeigt die Anzahl der Patienten mit DMARD (disease modifying antirheumatic drug)- bzw. Anti-Osteoporose-Therapie, welche die Knochendichte negativ bzw. positiv beeinflussen können. Die Verteilung auf die Gruppen zeigt dabei keine relevanten Unterschiede.

Tabelle 5: Zahl der Patienten mit DMARD- bzw. Anti-Osteoporose-Therapie

| | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gesamt |
|---------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Methotrexat | 5 | 4 | 9 |
| Vitamin D / Kalzium | 12 | 15 | 27 |
| Bisphosphonate | 6 | 7 | 13 |
| Östrogene | 2 | 0 | 2 |

3.1.2 Ergebnisse der einzelnen Parameter

3.1.2.1 Knochendichte

13 (31 %) Patienten zeigten in der Osteodensitometrie noch normale Werte, 16 (38,1%) eine Osteopenie (T-Score -1 bis -2,5) und 13 (31 %) eine Osteoporose (T-Score < -2,5). Zwischen den beiden Dosisgruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Der Median für den T-Score der Lendenwirbelsäule betrug für Gruppe 1 -1,24, für Gruppe 2 -1,19. Der p-Wert für den Unterschied zwischen beiden Gruppen war 0,218. Bei der Schenkelhalsmessung betrugen die Medianwerte für die T-Scores -1,92 (Gruppe 1) bzw. -2,05 (Gruppe 2). Der p-Wert war hier 0,781. Der Korrelationskoeffizient für nichtparametrische Korrelationen nach Spearman betrug für den Zusammenhang T-Score der Lendenwirbelsäule und Methylprednisolondosis -0,142. Damit war auch diese negative Korrelation bei einem p-Wert von 0,369 nicht signifikant. Ebenso verhielt es sich bei der Korrelation zwischen dem T-Score des linken Schenkelhalses und der durchschnittlichen Methylprednisolondosis in den vorangegangenen 12 Monaten. Hier betrug der Korrelationskoeffizient -0,098, der p-Wert 0,559.

Abb. 10 zeigt die graphische Darstellung der Knochendichte im Verhältnis zur Methylprednisolondosis. Man sieht eine in der Tendenz fallende Regressionsgerade, was bedeutet, dass bei höherer Methylprednisolondosis die durchschnittliche Knochendichte geringer ist.

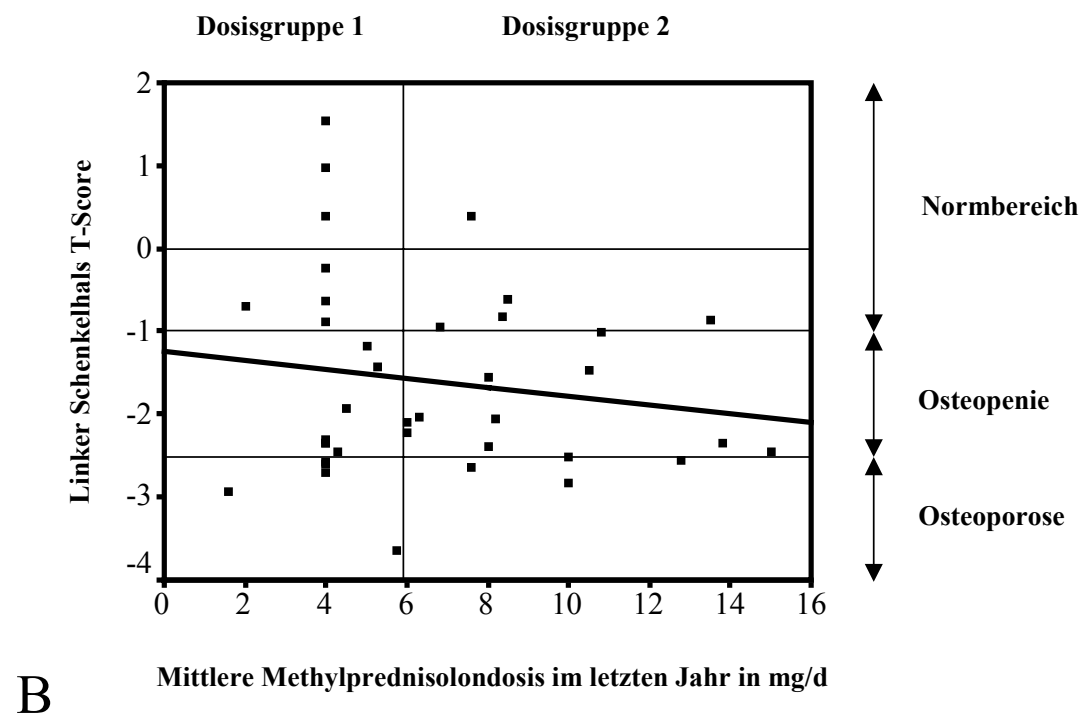
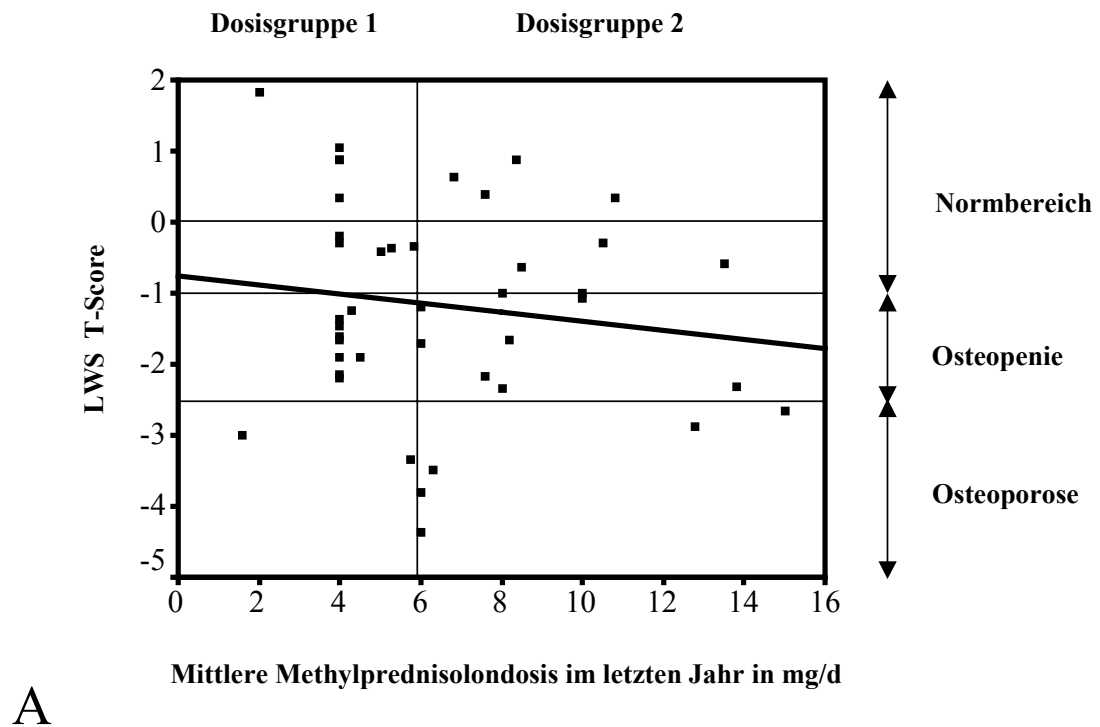


Abb. 10: Ergebnisse der Knochendichtemessungen (A: LWS, B: Schenkelhals) in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Methylprednisolondosis in den vorausgegangenen 12 Monaten. Die senkrechten Linien teilen die Dosisgruppe 1 von der Dosisgruppe 2, die waagerechten geben die Richtwerte bei der Osteodensitometrie an. Eingezeichnet ist auch die jeweilige Regressionsgerade. Für die Werte der Korrelationskoeffizienten siehe o.a. Text.

3.1.2.2 Knochenumsatzparameter

Knochenaufbauparameter: Bei keinem Patienten war die alkalische Phosphatase (AP) oder die knochenspezifische AP erhöht. 14 Patienten (33,3 %) wiesen einen erhöhten Osteocalcin-Wert auf. Von diesen bekamen vier eine Bisphosphonat-Behandlung, eine Patientin erhielt ein Östrogenpräparat.

Knochenabbauparameter: Bei 17 Patienten (40,5 %) war das Pyridinolin erhöht, bei elf (26,2 %) von diesen 17 auch das Desoxypyridinolin. Ein Patient hatte erhöhtes Desoxypyridinolin ohne erhöhtes Pyridinolin. Vier Patienten (9,5 %) wiesen einen erhöhten Wert für N-Telopeptid auf.

Vitamin D: Vier (9,5 %) Patienten hatten erniedrigte Werte für Calcidiol, zwölf (28,6 %) für Calcitriol.

Bei keinem Parameter gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Dosisgruppen.

Seibel bezeichnet die Knochenmasse als statische, die biochemischen Marker als dynamische Größe. Sie seien somit zwei komplementäre diagnostische Verfahren, die sich ergänzten.[70] Wie in Kapitel 2.1.5. dargelegt, eignen sie sich neben der Knochendichte als weitere Werte zur Vorhersage zukünftiger Frakturen. Aus diesem Grund sind in Tabelle 6 den Ergebnissen der Knochendichtemessung zwei biochemische Knochenabbauparameter gegenübergestellt.

Tabelle 6: Anzahl der Patienten mit normalen und pathologischen Werten für Knochendichte und zwei biochemische Knochenabbauparameter (Pyridinolin und Desoxypyridinolin)

| | Pyridinolin / Desoxypyridinolin erhöht | Pyridinolin / Desoxypyridinolin normal | Gesamt |
|-------------------------------------|---|---|---------------|
| normale Knochendichte | 6 | 7 | 13 |
| Osteopenie / Osteoporose | 12 | 17 | 29 |
| Gesamt | 18 | 24 | 42 |

41,4 % der Patienten mit verminderter Knochendichte wiesen demnach erhöhte Knochenabbauparameter auf. Demgegenüber zeigten 46,2 % der Patienten mit normaler Knochendichte erhöhte biochemische Marker.

3.1.2.3 Schmerzen der Wirbelsäule (Osteoporoseschmerzen)

Bewegungsschmerz (Anamnese)

Insgesamt 14 Patienten (33,3 %) gaben anamnestisch einen Bewegungsschmerz an (fünf [23,8 %] in Gruppe 1 und neun [42,9 %] in Gruppe 2). Auch hier zeigte der p-Wert mit 0,328 keinen signifikanten Unterschied.

Osteoporoseschmerzen (Anamnese)

Die Patienten wurden in der Anamnese nach Rückenschmerzen gefragt, die im Laufe des Tages und bei Belastung stärker werden bzw. beim Liegen und nachts nachlassen. Diese Art der Schmerzen wurde nochmals unterteilt in Schmerzen in Ruhe und bei Belastung. In Ruhe gaben ein Patient (4,8 %) der Gruppe 1 und fünf Patienten (23,8 %) der Gruppe 2 derartige Schmerzen an. Hier lässt sich eine Tendenz erkennen, wonach eine erhöhte Glucocorticoiddosis mehr osteoporosetypische Schmerzen hervorruft (p-Wert aus Chi-Quadrat nach Pearson: 0,067). Unter Belastung zeigten beide Dosisgruppen dagegen fast den gleichen Anteil an Patienten mit ostoporo-seartigen Schmerzen (42,9 % in Gruppe 1, 38,1 % in Gruppe 2).

Osteoporoseschmerzen (Visuelle Analogskala)

Bei der Einschätzung der Schmerzen durch die Patienten auf einer visuellen Analogskala zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosisgruppen. Die durchschnittlichen Werte betrugen 9,64 mm (Gruppe 1) und 28,76 mm (Gruppe 2), die Mediane betrugen 1 mm bzw. 15 mm. Der p-Wert, ermittelt durch nichtparametrischen Test nach Mann-Whitney-U, betrug 0,042.

Klopfschmerz (Klinik)

Bei zwei Patienten (9,5 %) in der unteren und sechs (28,6 %) in der oberen Dosisgruppe zeigte sich klinisch eine klopfschmerzhaftige Wirbelsäule. Es war jedoch mit einem p-Wert von 0,178 kein signifikanter Unterschied festzustellen.

3.1.2.4 Cushing-Symptomatik

Über die Hälfte der Patienten (52,4 % nach Angaben der Patienten, 61,9 % nach Angaben des Arztes) wies eine mehr oder weniger starke Cushing-Symptomatik (Fettumverteilung → „Mond-gesicht“, „Büffelnacken“, allgemeine Gewichtszunahme; Akne; Gesichtsrötung) auf (Abb.11). Die Zahl ist in der oberen Dosisgruppe etwas höher. Es besteht jedoch kein signifikanter Unter-schied (p-Wert aus Chi-Quadrat nach Pearson 0,217 bei Patientenangaben, 0,204 bei Arztanga-ben).

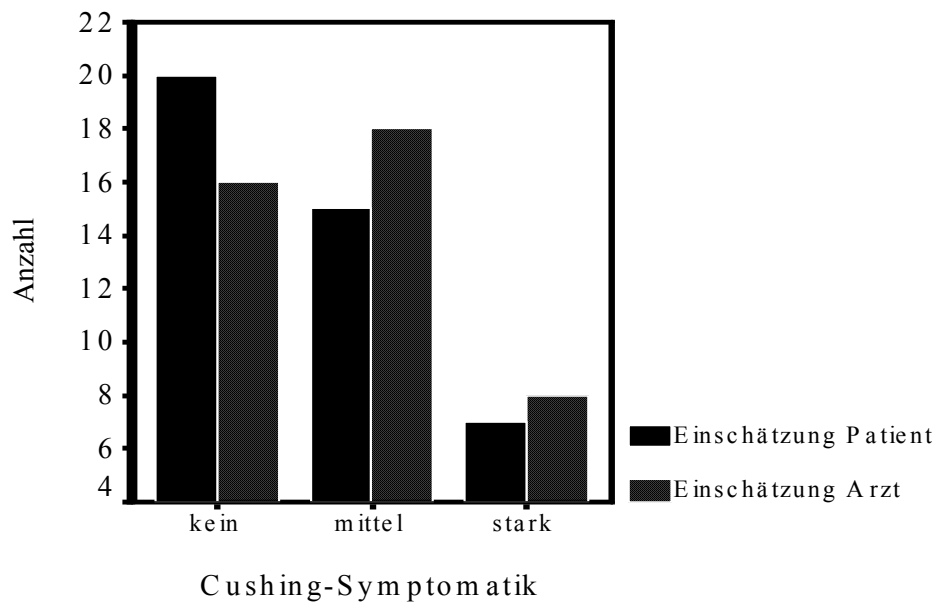


Abb. 11: Zahl der Patienten (keine Unterscheidung nach Dosisgruppen) mit unterschiedlich ausgeprägter Cushing-Symptomatik. n=42

3.1.2.5 Typische Hautveränderungen bei Glucocorticoidtherapie

Pergamenthaut und Unterblutungen sind typische durch Glucocorticoide verursachte Hautveränderungen. Wir fanden, dass in den zwei Vergleichsgruppen jeweils ca. $\frac{3}{4}$ der Patienten diese Veränderungen aufwiesen. Dagegen verzeichneten nur drei von 42 Patienten Striae distensae (Abb. 12). Auch bei diesen Veränderungen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Dosisgruppen.

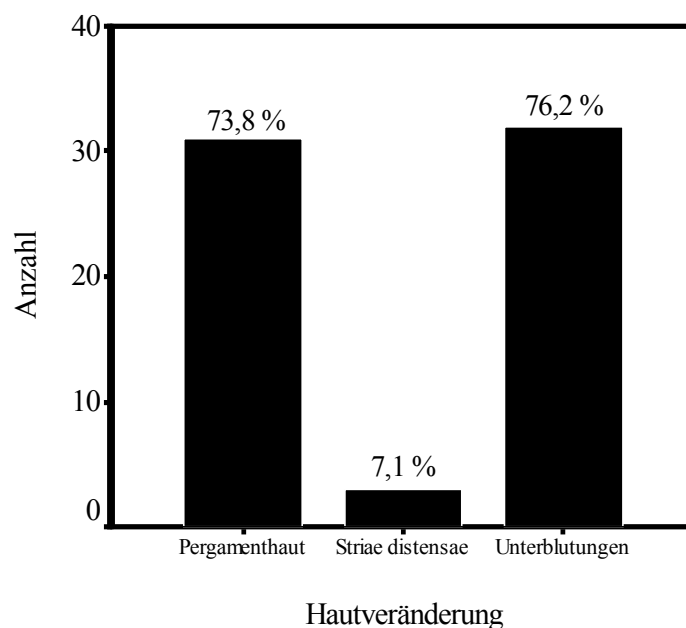


Abb. 12: Zahl der Patienten (keine Unterscheidung nach Dosisgruppen) mit typischen GC-induzierten Hautveränderungen. n=42

3.1.2.6 Veränderung des Augeninnendrucks

In der unteren Dosisgruppe gab eine Person (4,8 %) einen erhöhten Augeninnendruck an. Dies war deutlich weniger als in der oberen Dosisgruppe. Dort berichteten fünf Personen (23,8 %) von diesem Symptom. Es zeigte sich eine Tendenz, aber mit einem p-Wert von 0,101 kein signifikanter Unterschied.

3.1.2.7 Krankheitsaktivitätsparameter

Die Werte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie das C-reaktive Protein (CRP) bewegten sich allgemein in einem gut kontrollierten Bereich. Median und Durchschnittswert betrugen für die BSG jeweils etwa 25 mm/1. Stunde. Insgesamt neun Patienten wiesen eine BSG von mehr als 30 mm/1. Stunde auf. Ein Patient zeigte einen Spitzenwert von 67 mm/1. Stunde. Das CRP war in Gruppe 2 mit durchschnittlich 1,3 mg/dl (Median: 0,73 mg/dl) etwas höher als in Gruppe 1 (Durchschnitt: 0,73 mg/ml, Median 0,59 mg/dl), ein signifikanter oder tendenzieller Unterschied zeigte sich jedoch nicht (p-Werte jeweils größer 0,1). Fünf Patienten (11,9 %) hatten ein CRP > 2 mg/dl, ein Patient einen Spitzenwert von 6,49 mg/dl. (Dieser zeigte eine BSG von 25 mm/h.)

Auch bei der Einschätzung der Krankheitsaktivität durch Arzt und Patient mittels visueller Analogskala zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Dosisgruppen (p-Wert nach Mann-Whitney-U 0,927 bzw. 0,426). Hier waren die Werte der Selbsteinschätzung der Patienten in der unteren Dosisgruppe leicht höher als in der oberen (Median Gruppe 1: 48 mm, Gruppe 2: 37 mm), während die ärztliche Einschätzung jeweils ca. 20 mm im Median betrug.

3.1.2.8 Blutfette

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Dosisgruppen bei den Blutkonzentrationen für Triglyceride und Gesamtcholesterin. Der Durchschnittswert aller untersuchten Patienten für Triglyceride betrug 170 mg/dl bei einem Median von 135,5 mg/dl. Bei dem Gesamtcholesterin betrug der Durchschnittswert 246,2 mg/dl, der Median ist 242 mg/dl.

3.1.2.9 Lebensqualität

In keinem der vom Short Form 36 abgefragten Kategorien unterschieden sich die beiden Dosisgruppen signifikant voneinander. Es waren auch keine Tendenzen auszumachen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Unterschied zwischen den zwei Dosisgruppen im Hinblick auf die einzelnen Parameter des SF-36 Fragebogens

| SF-36-Kategorie | p-Wert für den Unterschied zwischen Dosisgruppe 1 und 2 |
|-----------------------------------|---|
| Körperliche Funktionsfähigkeit | 0,588 |
| Körperliche Rollenfunktion | 0,883 |
| Körperliche Schmerzen | 0,869 |
| Allgemeine Gesundheitswahrnehmung | 0,944 |
| Vitalität | 0,235 |
| Soziale Funktionsfähigkeit | 0,790 |
| Emotionale Rollenfunktion | 0,575 |
| Psychisches Wohlbefinden | 0,592 |

Körperliche Funktionsfähigkeit: Ausmaß, in dem der Gesundheitszustand körperliche Aktivitäten wie Selbstversorgung, Gehen, Treppen steigen, Bücken, Heben und mittelschwere oder anstrengende Tätigkeiten beeinträchtigt.

Körperliche Rollenfunktion: Ausmaß, in dem der körperliche Gesundheitszustand die Arbeit oder andere tägliche Aktivitäten beeinträchtigt, z.B. weniger schaffen als gewöhnlich, Einschränkungen in der Art der Aktivitäten oder Schwierigkeiten, bestimmte Aktivitäten auszuführen.

Körperliche Schmerzen: Ausmaß der Schmerzen und Einfluss der Schmerzen auf die normale Arbeit, sowohl im als auch außerhalb des Hauses.

Allgemeine Gesundheitswahrnehmung: Persönliche Beurteilung der Gesundheit, einschließlich aktueller Gesundheitszustand, zukünftige Erwartungen und Widerstandsfähigkeit gegenüber Erkrankungen.

Vitalität: Sich energiegeladener und voller Schwung fühlen versus müde und erschöpft.

Soziale Funktionsfähigkeit: Ausmaß, in dem die körperliche Gesundheit oder emotionale Probleme normale soziale Aktivität beeinträchtigen.

Emotionale Rollenfunktion: Ausmaß, in dem emotionale Probleme die Arbeit oder andere tägliche Aktivitäten beeinträchtigen; u.a. weniger Zeit aufbringen, weniger schaffen und nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten.

Psychisches Wohlbefinden: Allgemeine psychische Gesundheit, einschließlich Depression, Angst, emotionale und verhaltensbezogene Kontrolle, allgemeine positive Stimmung. (aus: SF-36 Fragebogen zum Gesundheitszustand – Handanweisungen, Monika Bullinger und Inge Kirchberger, Hogrefe-Verlag, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle, 1998)[87]

Im Vergleich zu einer deutschen Normpopulation sind die Werte des Studienkollektivs deutlich niedriger, was einem insgesamt schlechteren Gesundheitszustand entspricht. Abb. 13 zeigt die graphische Darstellung der beiden verglichenen Kollektive. Da das Normkollektiv eine nahezu paritätische Verteilung von männlichem und weiblichem Geschlecht aufweist, bei den untersuchten Patienten aber der weibliche Anteil stark überwog, werden in Abb. 14 die Geschlechter ge-

trennt dargestellt. Da die Werte der weiblichen Normalbevölkerung durchweg etwas niedriger sind, vermindert sich auch der Unterschied zum untersuchten Kollektiv geringfügig.

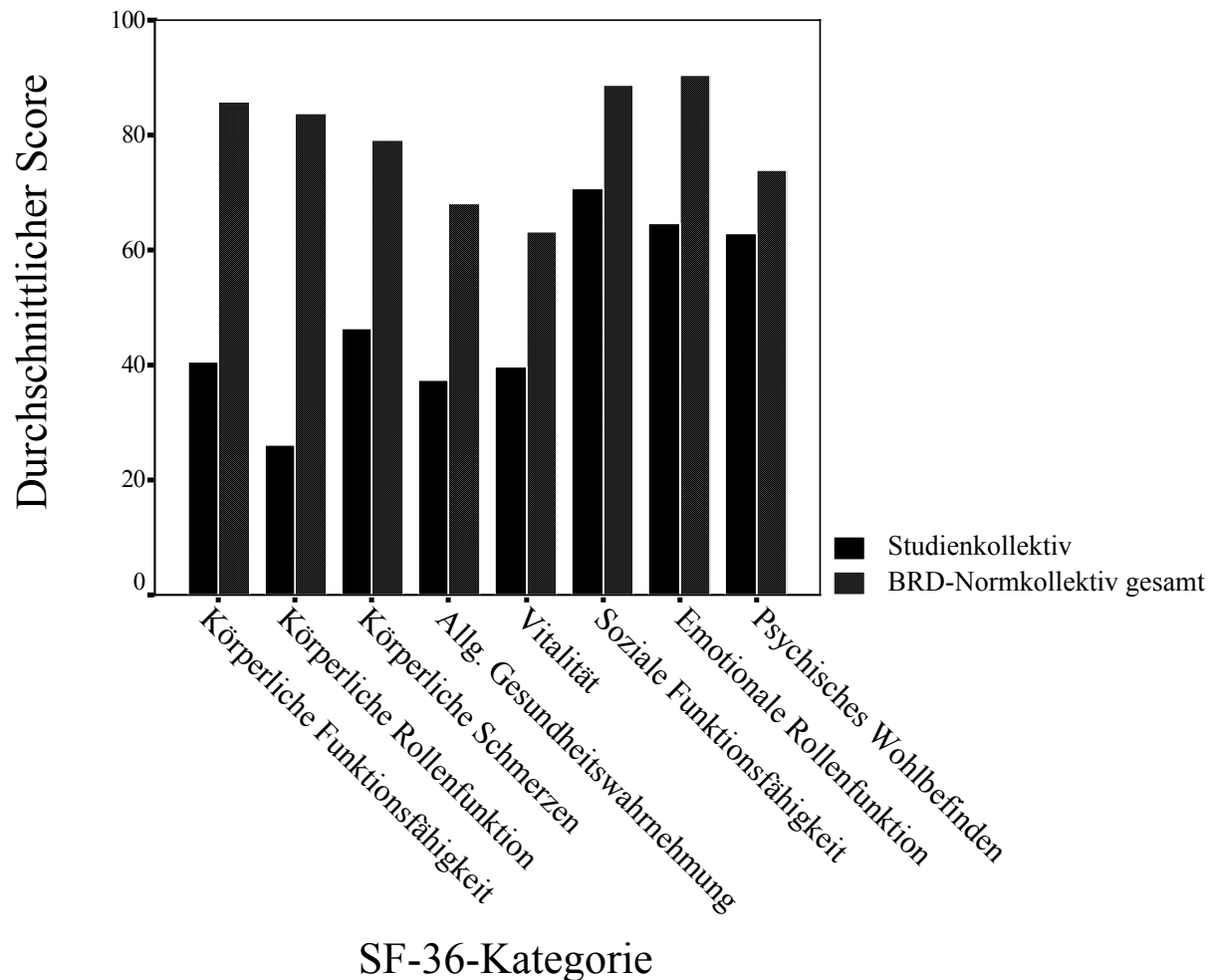


Abb. 13: Vergleich der Scores in den einzelnen Kategorien des SF-36-Fragebogens zwischen dem Studienkollektiv und einer bundesdeutschen Normpopulation. Daten aus: SF-36 Fragebogen zum Gesundheitszustand – Handanweisungen, a.a.O.[87]

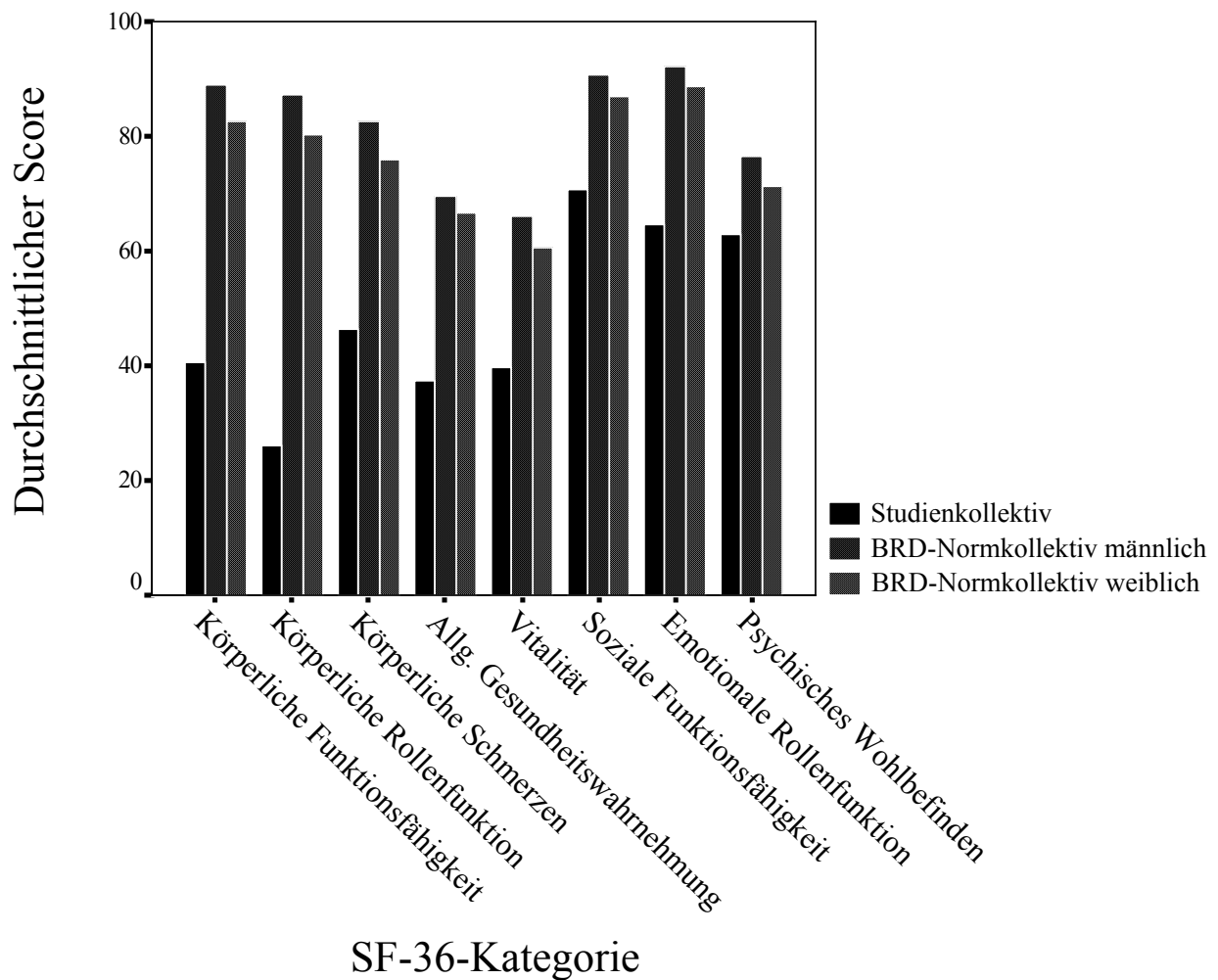


Abb. 14: Vergleich der Scores in den einzelnen Kategorien des SF-36-Fragebogens zwischen dem Studienkollektiv und einer bundesdeutschen Normpopulation, differenziert nach dem Geschlecht. Daten aus: SF-36 Fragebogen zum Gesundheitszustand – Handanweisungen, a.a.O.[87]

Die Auswertung des SF-36 erlaubt die Differenzierung in sog. körperliche und psychische Summenskalen.[87] Hierbei werden die einzelnen Kategorien gemäß ihrer Aussagekraft für den psychischen bzw. körperlichen Gesundheitszustand gewichtet. Die Auswertung erfolgt durch Berechnung von z-Werten für jede Subskala des SF-36. Hierfür wird der Mittelwert einer amerikanischen Normpopulation vom Mittelwert der untersuchten Population subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung der amerikanischen Normstichprobe dividiert. Durch Multiplikation der z-Werte mit Regressionskoeffizienten für die körperlichen und psychischen Faktoren der einzelnen SF-36-Subskalen erhält man die Rohwerte der Summenskalen. Höhere Werte entsprechen einem besseren Gesundheitszustand. Der Mittelwert der US-amerikanischen Normpopulation ist auf den Wert 50 normiert. Abb. 15 zeigt den Vergleich der psychischen und körperlichen Summenskalen.

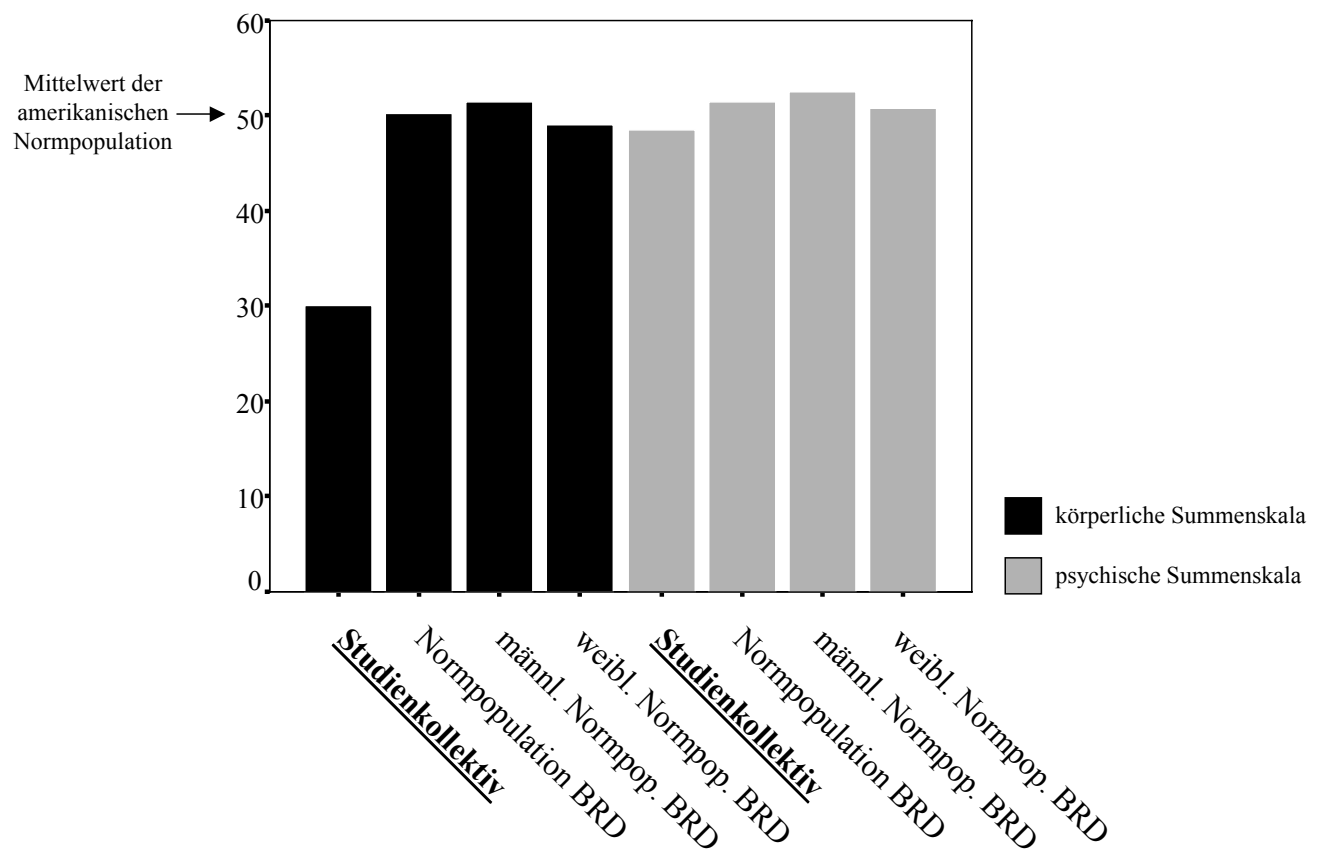


Abb. 15: Vergleich des Studienkollektivs mit bundesdeutschen Normpopulationen hinsichtlich der körperlichen und psychischen Summenskalen. Die Standardisierung erfolgt im Vergleich zu einer US-amerikanischen Normpopulation (Mittelwert = 50)

Man erkennt, dass die körperliche Summenskala deutlich stärker von den Vergleichswerten der Normpopulation nach unten abweicht als die psychische. Das Studienkollektiv zeigt mit ca. 30 einen deutlich niedrigeren Wert in der körperlichen Summenskala. Dies entspricht einem schlechteren physischen Gesundheitszustand.

3.2 Durchflusszytometrische Experimente

3.2.1 Ableitung der Standardisierungsbedingungen

3.2.1.1 Messung der mGCR-Expression auf CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit nach Auftauen

Die CCRF-CEM-Zelllinie diene als Färbekontrolle für unsere Experimente. Gametchu et al. wiesen die mGCR auf diesen Zellen zuerst nach und berichteten, dass die Zahl der pro Zelle exprimierten mGCR vom Zellzyklus abhängig ist.[44] Wir untersuchten daher zunächst, zu welchem Zeitpunkt die Expression verlässlich nachweisbar ist, um eine gut verwendbare Kontrolle zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden drei Aliquots zur gleichen Zeit aufgetaut und im Brutschrank inkubiert. Die mGCR-Expression wurde für das erste Aliquot 17 Stunden, für das zweite 41,5 Stunden und für das dritte 65 Stunden nach Aussetzung gemessen. Als Primärantikörper diene das *antiGCR-FITC*-Konjugat von Frau Dr. Berki. Ihm zugesetzt wurden das *antiFITC-Dig*-Konjugat sowie die *antiDig*-Liposomen (primär verwendetes Färbesystem, siehe Kap. 2.2.3.2.).

Zum ersten Zeitpunkt waren 4,98 % der Zellen positiv (Hintergrund: 0,62 % / Färbung: 8,56 % / Block: 3,58 %). Nach 41,5 Stunden waren 30,43 % der Zellen (0,17 % / 37,21 % / 6,78 %) und nach 65 Stunden noch 19,18 % der Zellen positiv (0,71 % / 30,51 % / 11,33 %).

Nach 41,5 Stunden war also die Expression am höchsten. Daher wurden im Weiteren CCRF-CEM-Zellen 39 – 42 h nach dem Auftauen als Kontrolle mitgeführt.

3.2.1.2 Optimierung des Antikörper-Färbesystems

Das Färbesystem *antiGCR-FITC* → *antiFITC-Dig* → *antiDig-Liposomen* zeigte zwar eindeutige Färbeergebnisse. Allerdings ließ sich auch nach der Inkubation mit höheren Konzentrationen des unmarkierten *antiGCR*-Antikörpers kaum ein Block-Ergebnis unter 5% erreichen; die unspezifische Färbung war zu hoch. Wir vermuteten eine Aggregatbildung der FITC-markierten Antikörper, wodurch möglicherweise auch einige unspezifische Epitope besetzt worden waren.

Wir versuchten daher zunächst, mögliche Aggregate durch Zentrifugieren bei 22000g für 10 Minuten zu separieren. Der Überstand wurde weiter verwendet. Außerdem inkubierten wir die Antikörpersuspension mit großen Mengen PBMC mit dem Ziel, eben diese Aggregate „herauszuwaschen“, indem sie an den Blutzellen hängen bleiben.

Da dies nicht den gewünschten Erfolg brachte, wechselten wir das Färbesystem, indem wir eine Direktkopplung der *antiGCR*-Antikörper mit Digoxigenin vornahmen. Daraus resultierte also folgendes Färbesystem: *antiGCR-Dig* → *antiDig-Liposomen* (siehe Abb. 8 und 9).

3.2.1.3 Antikörper-Konjugation, Färbe- und Block-AK-Konzentrationen

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, um das neue Färbesystem zu optimieren. Dazu gehörte die Identifizierung

- a) des optimalen Hapten : Antikörper-Verhältnisses,
- b) der optimalen Konzentration des Färbe-Antikörpers und
- c) der optimalen Konzentration des unmarkierten Antikörpers.

Zur Austitrierung des *anti*GCR-Dig-Konjugats wurde die CCRF-CEM-Zelllinie verwendet. Für die Färbekonzentration wurden fünf verschiedene Verdünnungen getestet (1:500, 1:200, 1:100, 1:50 und 1:25). Darüber hinaus wurden drei verschiedene Konjugations-Verhältnisse (das heißt die Zahl von Haptenen, die mit einem Antikörper-Protein konjugiert werden) getestet: 10:1, 30:1 sowie 50:1. Es zeigte sich, dass der Ansatz mit dem Molverhältnis von 10:1 (Hapten : AK) bei einer Verdünnung von 1:50 die besten Ergebnisse aufwies. Bei den Ansätzen 30:1 und 50:1 gab es jeweils eine sehr hohe unspezifische Färbung.

Die Verdünnung von 1:50 entspricht einer Färbekonzentration von ca. 7 µg/ml (Proteinkonz.: 0,356 mg/ml). Nach Blockade zeigte sich eine Anzahl positiver CCRF-CEM-Zellen von deutlich unter 5 %. Mit diesem Messsystem waren in der Nettofärbung durchschnittlich 10,7 % der Zellen positiv für mGCR.

Um den erwähnten Block zu erreichen, wurde der unmarkierte Antikörper in ca. 70fachem Überschuss eingesetzt (15 µl auf 40µl Gesamtfärbevolumen bei einer Proteinkonzentration zwischen 1,3 und 1,4 mg/ml).

3.2.1.4 Blockade durch Vorinkubation der *anti*GCR-AK mit dem Antigen APTEK26

Die Blockade der Färbung durch unmarkierte Antikörper im Überschuss zeigte bereits die Spezifität der Markierung in der Durchflusszytometrie. Dennoch sollte dieses Ergebnis noch untermauert werden, indem eine epitopspezifische Blockade mit APTEK26 durchgeführt wurde. Es handelt sich um das 26 Aminosäuren lange Peptidfragment aus der Regulationssequenz des Glucocorticoidrezeptors (von Position 150 bis 176), welches für die Produktion der Antikörper verwendet wurde. Es stellt das Epitop dar, gegen das diese Antikörper gerichtet sind (siehe Abb. 2). Zur Blockade wurde der Färbeantikörper mit dem Antigen vorinkubiert. Dafür wurden in 30 µl PBS/BSA/NaN₃ 2 µl des Färbeantikörpers mit 2 µl des Antigens (Konz. 1 mg/ml) für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Der Block fiel meist etwas schwächer aus als mit unmarkiertem Antikörper, war aber dennoch deutlich, was auf die Spezifität der Färbung hinweist. Abb. 16 zeigt eine typische Färbung.

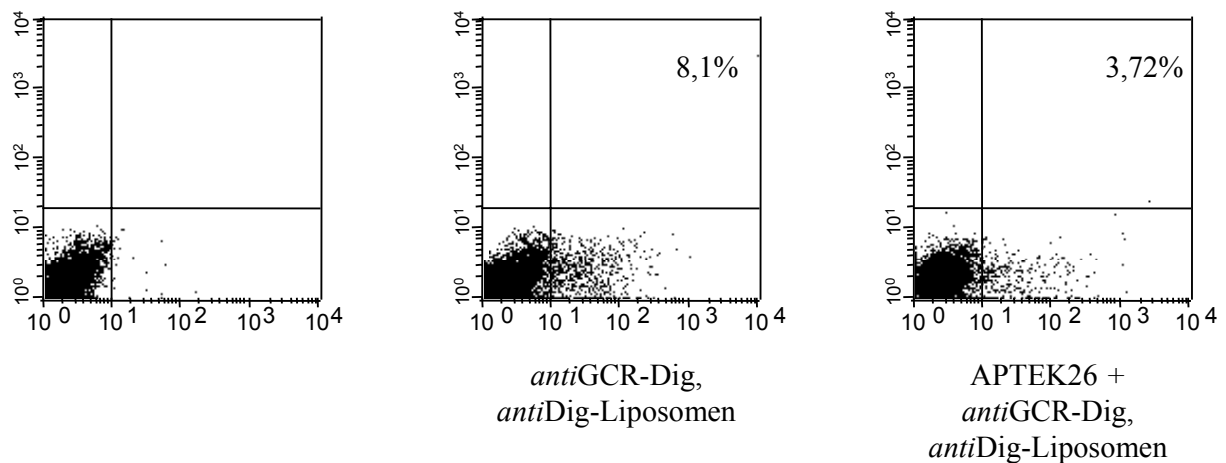


Abb. 16: Nachweis der Spezifität der Färbung durch Blockade des Signals nach Vorinkubation des *antiGCR*-Antikörpers mit dem Epitop-Peptid APTEK26

3.2.2 Intrazelluläre Färbung der CCRF-CEM-Zellen

Die intrazelluläre Färbung dient der Detektion der zytosolischen GCR. Sie erfolgte mit *antiGCR*-Dig als Primär- und *antiDig*-Cy5 als Sekundärantikörper. Es zeigte sich, dass alle CCRF-CEM-Zellen positiv für iGCR waren. Die Blockade war nahezu vollständig, was auf eine spezifische Färbung hinweist (Abb. 17).

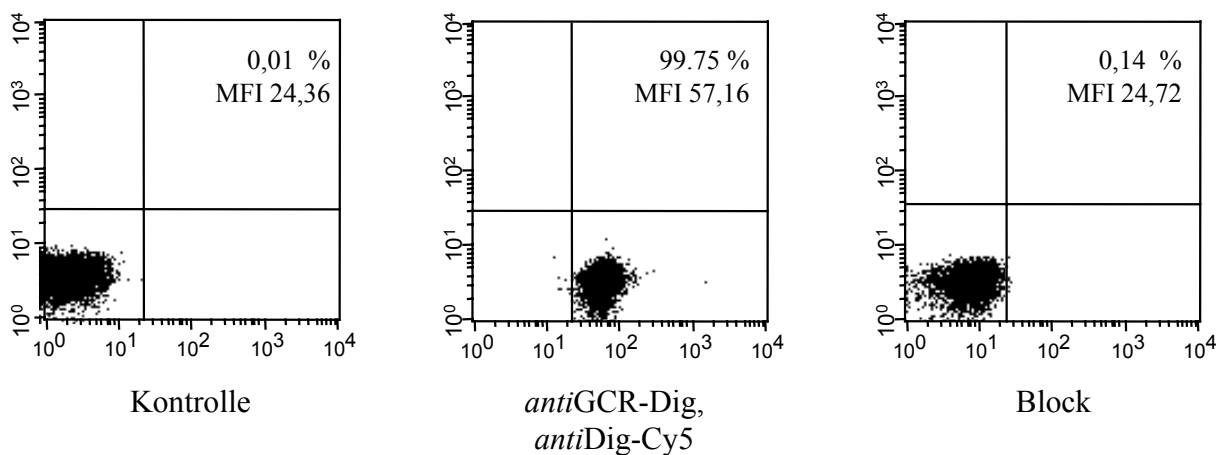


Abb. 17: Intrazelluläre Färbung der CCRF-CEM-Zellen.

Es handelte sich um eine homogene Population, bei der alle Zellen gefärbt und blockiert wurden. Daher ist hier die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) angegeben. Diese war nach Blockade so hoch wie bei der Kontrolle, was die Spezifität der Färbung bestätigt.

3.2.3 Vergleich der konventionellen Oberflächenfärbung mit der Liposomenfärbung

Wir verglichen die Oberflächenfärbungen vitaler Zellen der CCRF-CEM-Zelllinie nach konventioneller Methode sowie nach der hochsensitiven Immunfluoreszenzmethode mittels Liposomen. Für die konventionelle Färbung kam das gleiche Färbesystem wie für die intrazelluläre Färbung zum Einsatz (*antiGCR-Dig* → *antiDig-Cy5*). Die Zellen wurden allerdings nicht permeabilisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

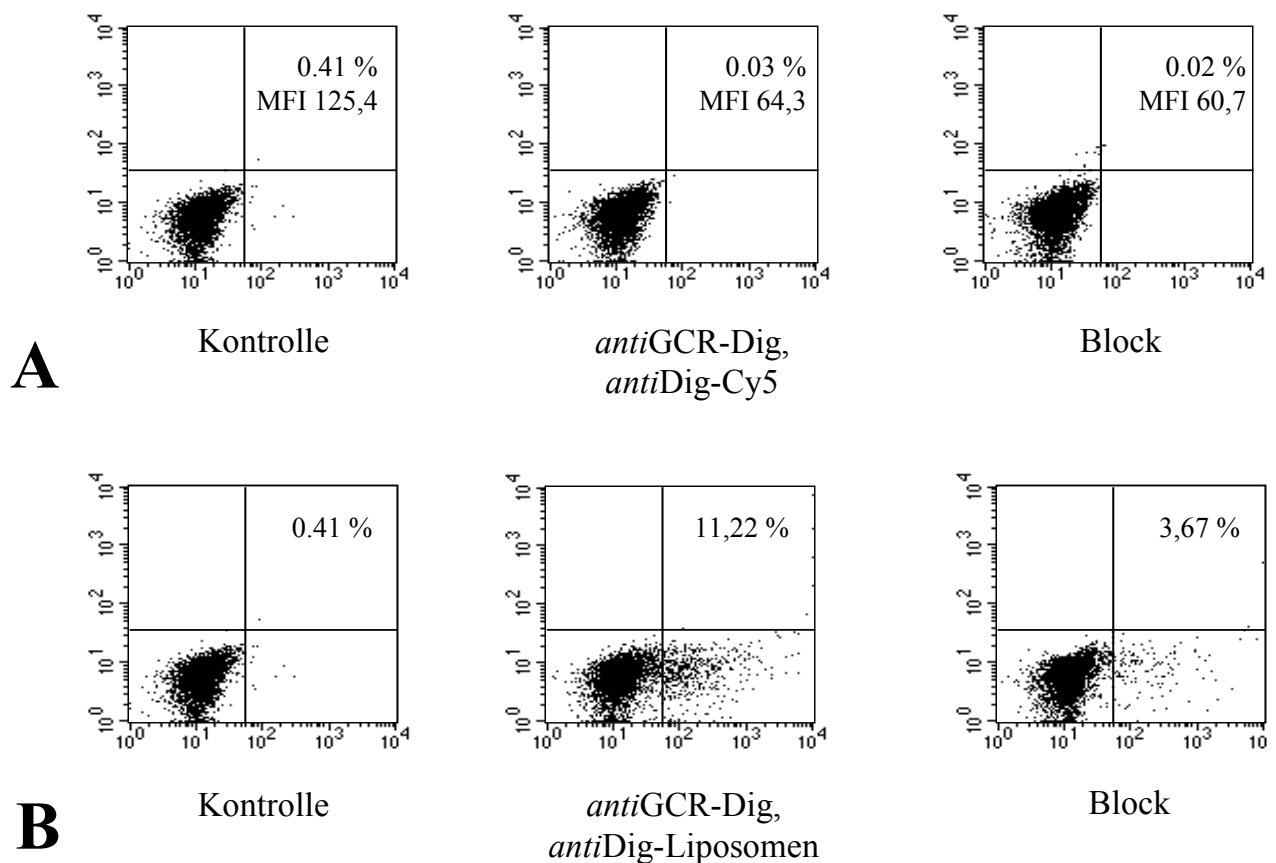


Abb. 18: Oberflächenfärbung auf CCRF-CEM-Zellen. A: konventionelle Färbung, B: Liposomenfärbung

Die Abbildungen zeigen, dass es nur mit der Liposomenfärbung gelingt, die durch Gametchu et al. identifizierten membranständige Rezeptoren in ihrer Existenz zu bestätigen. Die konventionelle Färbung ist dazu nicht in der Lage. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der MFI zwischen Kontrolle, Färbung und Block. Das System, das zuvor alle Zellen positiv für zytosolische GCR testete, zeigt demnach kein spezifisches Signal für Oberflächenrezeptoren. Im gleichen Versuchsansatz wurden mit der Liposomenfärbung über 7,5 % der Zellen (Nettofärbung) positiv detektiert.

3.2.4 Untersuchungsergebnisse gesunder Probanden

Nach erfolgreicher Etablierung und Optimierung des Liposomentestsystems wurde zunächst eine Messreihe mit den PBMC gesunder Probanden durchgeführt, um Normalwerte zu erhalten. Vorausgegangene Experimente wiesen darauf hin, dass sich auch bei Gesunden mGCR nachweisen lassen. Dieser Nachweis gelang vor allem auf den *Monozyten* deutlich. Wir untersuchten insgesamt 14 Probanden im Alter zwischen 21 und 44 Jahren. Von diesen waren vier weiblich und zehn männlich. Eine genaue Befragung ergab, dass drei Probanden in den vorausgegangenen vier Wochen einen Infekt (grippaler Infekt, Tonsillitis, fiebrige Erkältung) durchgemacht hatten. Diese wiesen im Vergleich zu den anderen z.T. deutlich höhere Werte an mGCR-positiven Monozyten auf. Sie wurden daher nicht für die Erfassung der Normalwerte herangezogen. Die verbleibenden 11 Probanden (acht männlich, drei weiblich) wiesen durchweg keine Färbung auf *T-Lymphozyten* auf. Auf *B-Lymphozyten* und *Monozyten* ergab sich folgendes Bild:

Tabelle 8: mGCR-Expression bei gesunden Spendern (n = 11)

| Zelltyp | durchschnittliche mGCR-Expression in % | Standard- abweichung | Minimum / Maxi- mum in % | Median in % |
|----------------|---|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| B-Lymphozyten | 2,79 | 1,22 | 0,2 / 5,04 | 2,64 |
| Monozyten | 4,67 | 1,33 | 2,96 / 7,16 | 4,23 |

Dies bedeutet, dass bei gesunden Individuen durchschnittlich ca. 4,5 % der Monozyten und knapp 3 % der B-Lymphozyten mGCR exprimieren.

Bei den Probanden mit Zustand nach einem Infekt zeigte sich ebenfalls keine Expression auf T-Lymphozyten. Auf den anderen zwei Zellarten erzielten wir folgendes Ergebnis:

Tabelle 9: mGCR-Expression bei Spendern, die aufgrund vorausgegangener Infekte aus der Gruppe der „Gesunden“ ausgeschlossen wurden

| Proband | Zelltyp | mGCR-Expression in % | Ausschlussgrund |
|------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1 (männlich, 28 Jahre) | B-Lymphozyten | 0,98 | fiebrige Erkältung ca. 20 Tage zuvor |
| | Monozyten | 11,36 | |
| 2 (männlich, 36 Jahre) | B-Lymphozyten | 8,09 | grippaler Infekt ca. 14 Tage zuvor |
| | Monozyten | 17,17 | |
| 3 (weiblich, 28 Jahre) | B-Lymphozyten | 7,54 | Tonsillitis, unspezifische Arthritis |
| | Monozyten | 28,51 | |

Proband 2 und 3 konnten nochmals im Verlauf gemessen werden. Nach einem Monat waren die Werte für Probandin 3 auf 12,52 % positive Monozyten und 5,58 % positive B-Lymphozyten gesunken – bei auskuriertem Tonsillitis und deutlich verminderter Arthritissymptomatik. Proband 2 hatte sich einen Tag nach der Messung einer Tetanus-Diphtherie-Auffrischimpfung unterzogen. Bei ihm waren die Werte nach einem Monat sogar noch höher. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern allgemein Immunstimuli wie Infektionen, Entzündungen oder Impfungen auch die Expression von mGCR – zumindest auf Monozyten – stimulieren.

3.2.5 Systematische Untersuchung von Probanden mit Hepatitis B-Impfung

Um diese Frage zu klären, untersuchten wir die mGCR-Expression auf PBMC von 2 Probanden, die sich zeitgleich einer 3. Hepatitis-B-Auffrischimpfung unterzogen. Es wurden jeweils 6 Messungen innerhalb eines Zeitraums von bis zu 3 Monaten durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt die Resultate auf Monozyten und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten wiesen keine Färbung auf. Abbildung 20 zeigt die Resultate von Proband 2 in der Plot-Darstellung des Durchflusszytometers.

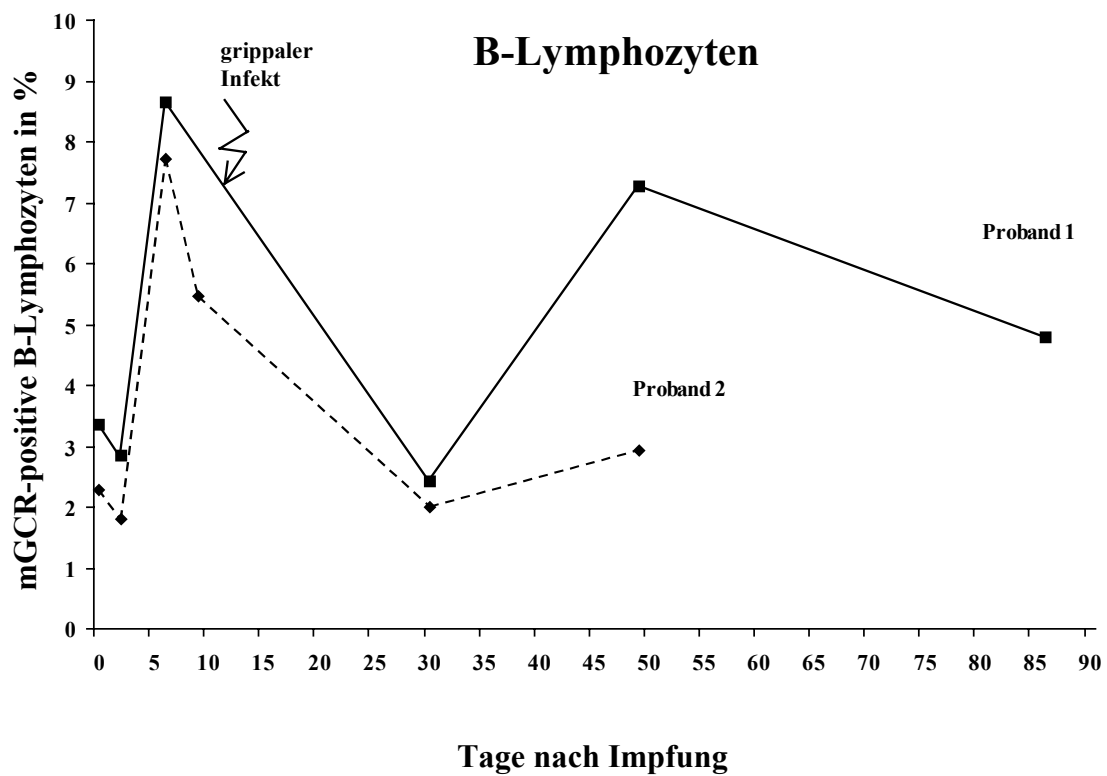
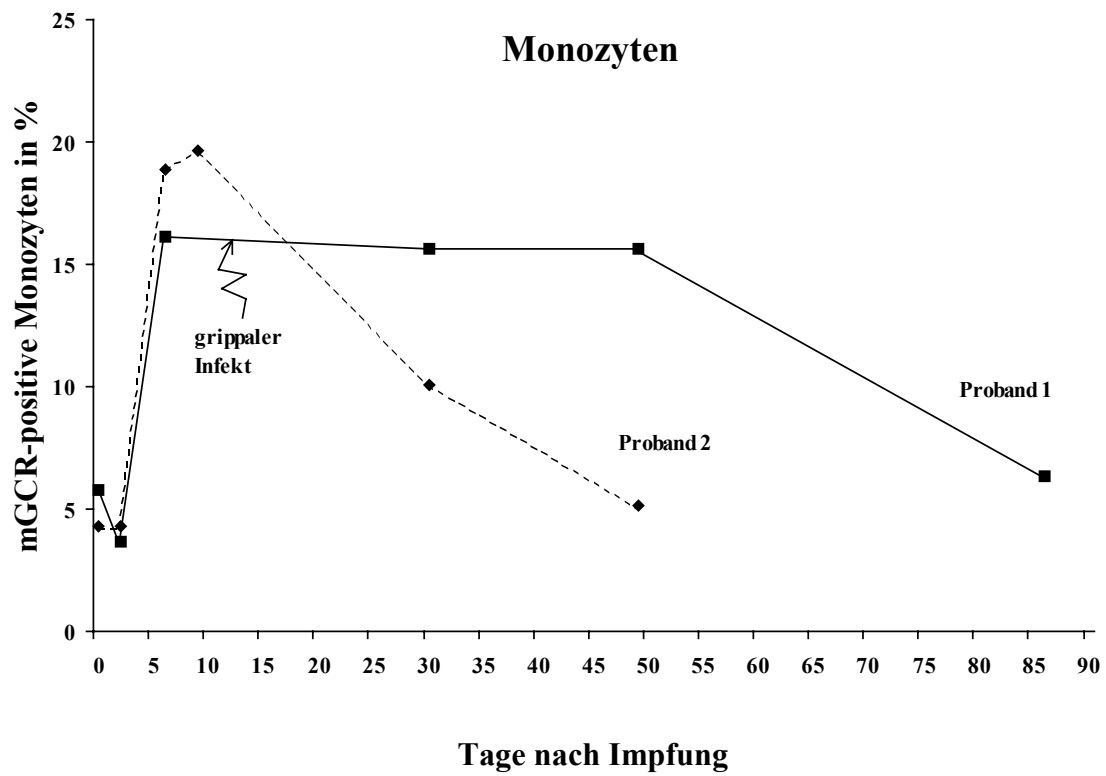


Abb. 19: mGCR-Expression auf Monozyten und B-Lymphozyten nach Impfung im Verlauf (Nettofärbung). Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt, an dem Proband 1 an einem grippalen Infekt erkrankte.

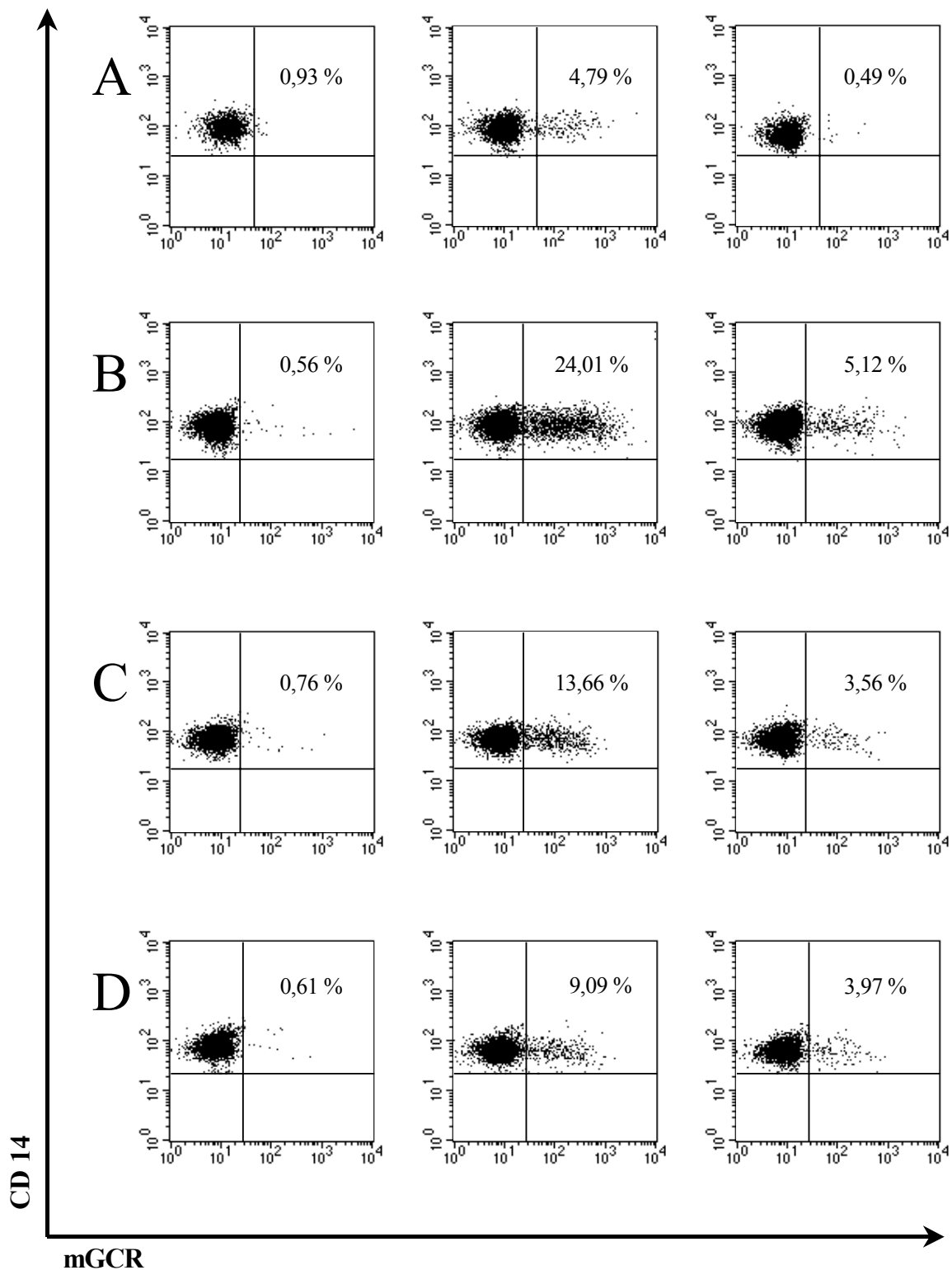


Abb. 20: Verlauf der Messung von mGCR auf Monozyten im Zusammenhang mit einer Hepatitis-B-Impfung. Die Buchstaben markieren die Zeitpunkte. Zeitpunkt A ist unmittelbar vor der Impfung, B am sechsten Tag, C einen Monat und D sieben Wochen nach der Impfung. Es werden jeweils die Kontrolle, die Absolutfärbung sowie die Färbung nach Blockierung dargestellt. Die Nettowerte (spezifische Färbung) ergeben sich jeweils aus der Differenz zwischen Absolutfärbung und Färbung nach Block.

Man erkennt, dass bei der 3. Messung sechs Tage nach der Impfung die Werte für mGCR-positive Monozyten deutlich angestiegen sind. Im weiteren Verlauf fielen die Werte langsam über Wochen ab. Die Messungen erfolgten jeweils so lange, bis sich die Werte wieder an die der Anfangsmessung angenähert hatten. Dies dauerte bei Proband 1 mehr als einen Monat länger als bei Proband 2. Als Ursache hierfür diskutieren wir einen grippalen Infekt, an dem Proband 1 circa 2 Wochen nach der Impfung erkrankt war. Der Zeitpunkt ist in der Abbildung 19 zu erkennen.

Bei den B-Lymphozyten ist der Verlauf zunächst ähnlich wie bei den Monozyten. Allerdings sieht man einen deutlich schnelleren Abfall der Werte bei geringeren Maximalwerten.

3.2.6 Messung der mGCR auf PBMC einer unbehandelten SLE-Patientin

Es wurde eine Patientin untersucht, die an einem Systemischen Lupus erythematoses leidet und im akuten Schub stationär eingewiesen wurde. Sie hatte zuvor ohne ärztliche Rücksprache alle verordneten Medikamente abgesetzt. Die Blutabnahme erfolgte, nachdem am Abend zuvor eine hochdosierte Glucocorticoidtherapie mit 100 mg Prednisolon begonnen worden war.

Auf *T-Lymphozyten* ließ sich keine Expression von mGCR nachweisen.

Die *B-Lymphozyten* zeigten mit einer spezifischen Färbung von 2,77 % keine erhöhten Werte im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv.

Die *Monozyten* dagegen wiesen mit einer spezifischen Färbung (Nettofärbung) von 36,76 % den höchsten überhaupt gemessenen Wert auf.

3.2.7 Messung der mGCR auf PBMC von Patienten mit rheumatoider Arthritis

In einer weiteren Gruppe von Experimenten sollte die Expression von mGCR auf PBMC bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen untersucht werden. Die Messungen an den geimpften Probanden ließ einen Einfluss immunologischer Aktivität auf die Expression von mGCR vermuten. Im Hinblick auf die klinisch-therapeutische Relevanz sollten diese Experimente nun zeigen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen (autoimmuner) Krankheitsaktivität und der Expression von mGCR. Um ein möglichst einheitliches Kollektiv zu erhalten, wurden nur Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis eingeschlossen, da die Aktivität dieser Erkrankung gut zu erfassen und zu beschreiben ist. Sie wurden aus einer klinisch sehr gut charakterisierten Patientengruppe in unserer Klinik rekrutiert. Wir untersuchten 19 Patientinnen und Patienten im Alter von 31 bis 72 Jahren (im Durchschnitt 50,5 Jahre). Von diesen waren 4 männlich und 15 weiblich.

Es fiel auf, dass bei vielen dieser Patienten vor allem unter den *Monozyten* ein relativ großer

Prozentsatz der Zellen positiv für mGCR war. Die *T-Lymphozyten* zeigten in keinem Fall eine mGCR-Expression. Tabelle 10 zeigt die Werte für *B-Lymphozyten* und *Monozyten*.

Tabelle 10: mGCR-Expression bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (n =19)

| Zelltyp | durchschnittliche mGCR-Expression in % | Standard-abweichung | Minimum / Maximum in % | Median in % |
|---------------|--|---------------------|------------------------|-------------|
| B-Lymphozyten | 4,15 | 2,15 | 0,69 / 9,89 | 3,77 |
| Monozyten | 10,13 | 4,85 | 3,32 / 19,58 | 8,32 |

In Abbildung 21 sind die Verteilungen der mGCR-Expression bei gesunden Spendern und Patienten mit rheumatoider Arthritis einander gegenübergestellt.

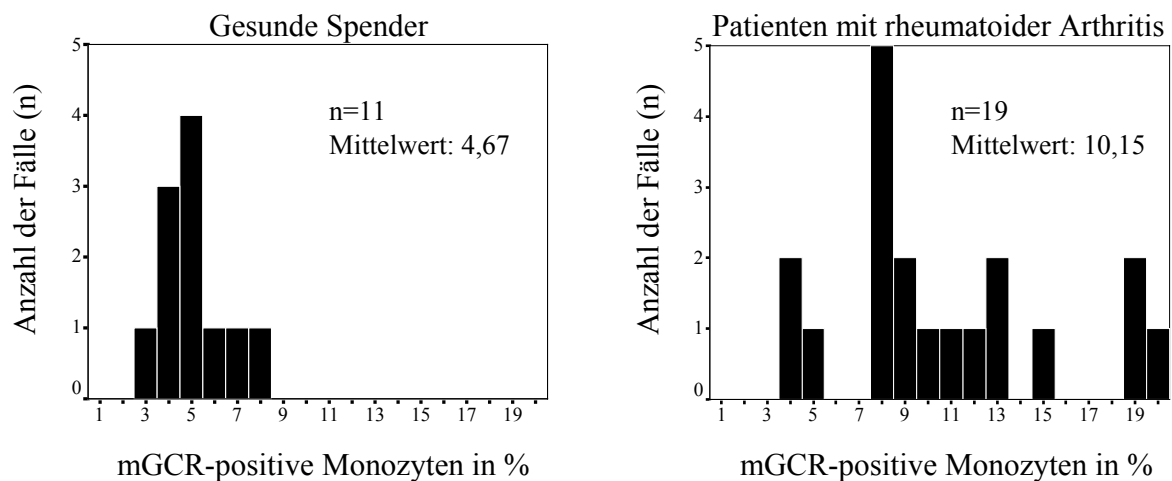


Abb. 21: Histogrammdarstellung der Verteilungen der mGCR-Expression auf Monozyten bei gesunden Spendern und Patienten mit rheumatoider Arthritis

Man sieht, dass die Verteilungsbreite, die durchschnittliche Expression in % der Zellen, sowie die Maximalwerte bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis deutlich höher sind als bei den gesunden Spendern.

Wir untersuchten nun systematisch die Korrelation zwischen der Zahl mGCR-positiver PBMC und der Höhe der Krankheitsaktivität. Als Maß für diese dienten die in Kapitel 2.3. dargestellten Parameter. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die jeweiligen Diagramme und Korrelationen.

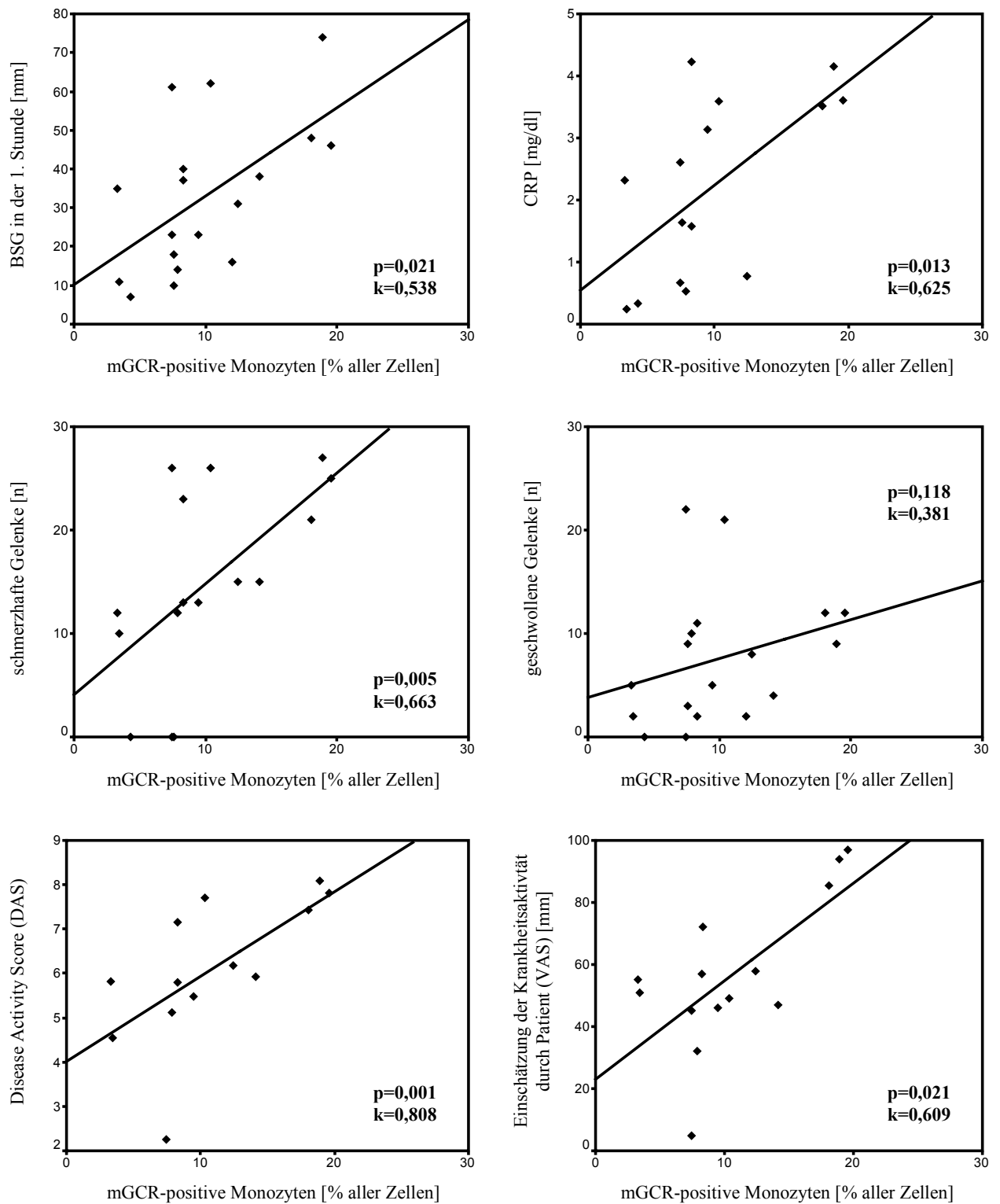


Abb. 22: Korrelationen der mGCR-positiven Monozyten mit unterschiedlichen Krankheitsaktivitätsparametern. p = p -Wert, k =Korrelationskoeffizient

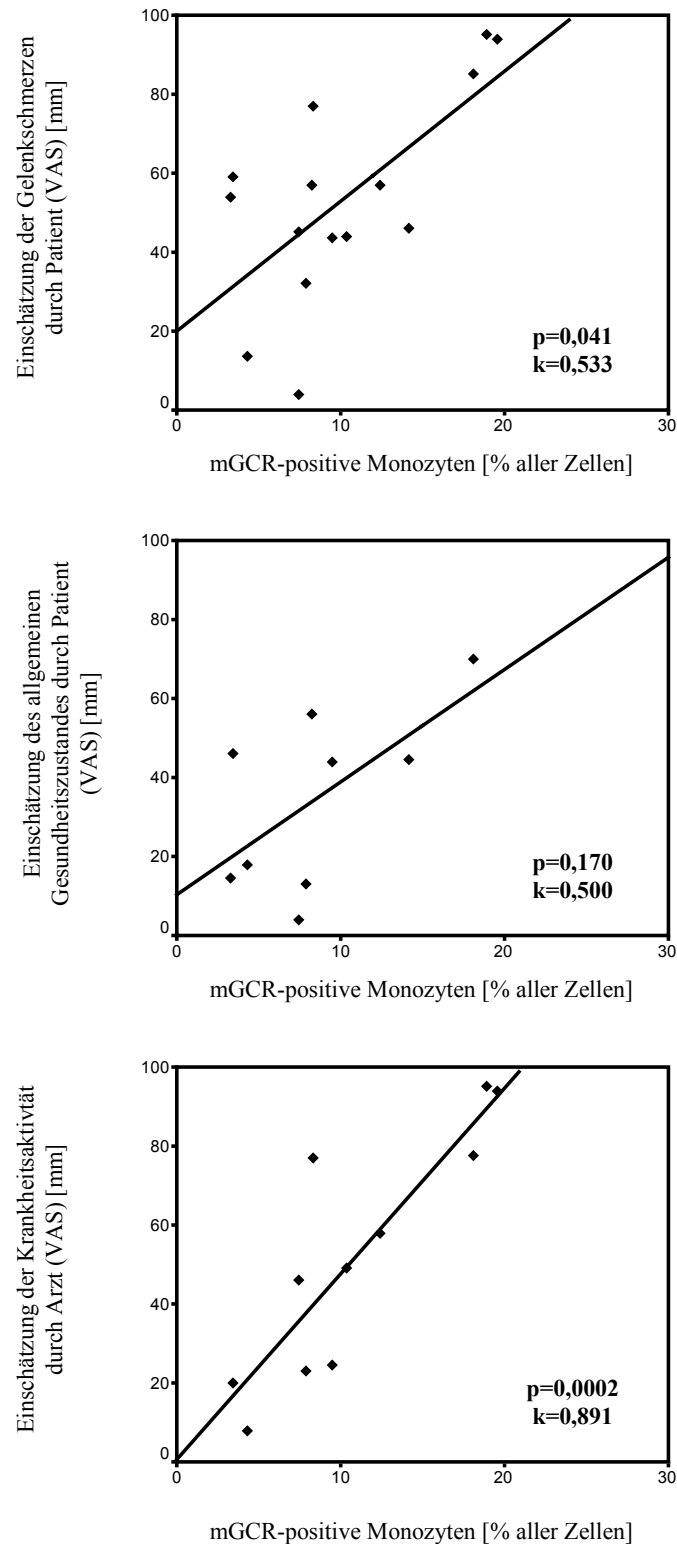


Abb. 23: Korrelationen der mGCR-positiven Monozyten mit unterschiedlichen Krankheitsaktivitätsparametern. p = p -Wert, k =Korrelationskoeffizient

Die jeweils eingezeichnete Regressionsgerade zeigt immer eine positive Korrelation. Dies bestätigt die Statistik. Da die Verteilungen der Werte der Variablen nicht einer Normalverteilung ent-

sprachen, wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient als Maß für einen monotonen Zusammenhang ermittelt.

In Tabelle 11 werden die Korrelationskoeffizienten sowie die p-Werte für die Signifikanz dargestellt:

Tabelle 11: Statistischer Zusammenhang zwischen mGCR-Expression auf Monozyten und verschiedenen Krankheitsaktivitätsparametern

| Korrelation von mGCR-positiven Monozyten mit: | Korrelationskoeffizient (Spearman) | p-Wert |
|--|---|---------------------------|
| BSG | 0,538 | 0,021 |
| CRP | 0,625 | 0,013 |
| schmerzhafte Gelenke | 0,663 | 0,005 |
| geschwollene Gelenke | 0,381 | 0,118 (nicht signifikant) |
| VAS 1 | 0,609 | 0,021 |
| VAS 2 | 0,533 | 0,041 |
| VAS 3 | 0,500 | 0,170 (nicht signifikant) |
| VAS 4 | 0,891 | 0,0002 |
| DAS | 0,808 | 0,001 |

VAS 1 = Einschätzung der Krankheitsaktivität durch Patient; VAS 2 = Einschätzung der Gelenkschmerzen durch Patient; VAS 3 = Einschätzung der allgemeinen Krankheitsaktivität durch Patient; VAS 4 = Einschätzung der Krankheitsaktivität durch Arzt; DAS = disease activity score. Die fett gedruckten Werte und Parameter markieren die statistisch signifikanten Korrelationen.

Die Einschätzungen der Aktivität der Krankheit (VAS 1) durch den Patienten, seiner Gelenkschmerzen (VAS 2) sowie des Gesundheitszustandes allgemein ohne die Symptome der Grunderkrankung (VAS 3) erfolgten jeweils zum Zeitpunkt der Untersuchung. Die Einschätzung des Arztes bezieht sich auf die globale Krankheitsaktivität (VAS 4) ebenfalls zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Außer bei den geschwollenen Gelenken und bei dem VAS 3 (Einschätzung der allgemeinen Gesundheit durch den Patienten) zeigen alle Aktivitätsparameter eine signifikant positive Korrelation mit der Zahl mGCR-positiver Monozyten. Die höchste Korrelation weisen der VAS 4 (Aktivitätseinschätzung der Krankheit durch den Arzt) und der DAS (globaler Aktivitätsparameter) auf.

Für die *B-Lymphozyten* ließ sich weder graphisch noch rechnerisch ein Zusammenhang zwischen mGCR-Expression und Krankheitsaktivität erkennen. Es gab sowohl erhöhte Werte als auch solche, die sich im Bereich der Werte der gesunden Probanden bewegten. Auch Patienten mit

sehr hohen Werten auf den Monozyten wiesen zum Teil solch einen niedrigen Anteil mGCR-positiver B-Lymphozyten auf.

T-Lymphozyten zeigten bei keinem der Patienten eine signifikante Expression von mGCR.

3.2.8 Messung auf Granulozyten

Wir stellten bei humanen PBMC die Existenz von mGCR auf Monozyten und B-Lymphozyten, nicht aber auf T-Lymphozyten fest. In einem weiteren Versuchsansatz untersuchten wir Granulozyten auf mGCR-Expression. Hierzu wurde nach Abnahme der PBMC-reichen Interphase auch der Ficoll-Plasma-Rest im Falcon[®]-Röhrchen abpipettiert. Die aus Erythrozyten und Granulozyten bestehende unterste Schicht wurde 1:1 mit RPMI-Medium gemischt und sodann im Verhältnis 1:5 mit einem Lyse-Puffer versetzt. Nach 15 Minuten auf Eis waren die Erythrozyten lysiert, die verbleibenden Granulozyten wurden zweimal gewaschen. Die Färbeprozedur war die gleiche wie bei den PBMC.

Die Nettofärbung bei zwei Probanden betrug 0,16 bzw. 0,73 % (1,23 / 2,12 / 1,96; 0,93 / 2,83 / 2,1). Angesichts der Fehlerbreite der Methode ist dies nicht als positiver Nachweis zu werten.

Diesen Experimenten zufolge werden also von Granulozyten keine mGCR exprimiert.

4 Diskussion

Glucocorticoide sind aus der Behandlung vieler verschiedener Krankheiten nicht mehr weg zu denken. Bereits seit über einem halben Jahrhundert sind sie im klinischen Einsatz, und dennoch sind noch einige Fragen zu Mechanismen und klinischem Einsatz offen. Die dosisabhängigen Wirkungen und Nebenwirkungen im low-dose Bereich gehören ebenso dazu wie die weitere Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen. Auf diesen beiden Gebieten soll die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse beitragen.

4.1 Untersuchungen zu Wirkungen, Nebenwirkungen und Lebensqualität bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unter low-dose Glucocorticoidtherapie am Beispiel von Methylprednisolon

In den letzten Jahren hat sich die niedrig und niedrigst dosierte Glucocorticoidtherapie mehr und mehr durchgesetzt. Der Hintergrund dafür ist, dass die vielfältigen unerwünschten Wirkungen der Glucocorticoide bei erhaltener Wirksamkeit möglichst gering ausgeprägt sein sollen. Harris bezeichnete schon Anfang der 80er Jahre die low-dose Glucocorticoidtherapie als Brückentherapie für den Gebrauch mit anderen Antirheumatika.[88] Bis zu 15 mg Prednisolonäquivalent pro Tag kann man in der Literatur unter dem Begriff low-dose GC-Therapie finden. In letzter Zeit wird die Grenze allerdings häufig niedriger gezogen.[61] Es besteht weitgehende Einigkeit darüber, dass die unerwünschten Wirkungen mit steigender Dosis zu-, mit geringer werdender Dosis abnehmen.[11, 13] Ab welcher Dosierung von einem sicheren Gebrauch der GC gesprochen werden kann, bleibt jedoch kontrovers. Die Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass bestimmte Wirkungen der GC manchmal nur unscharf von solchen der behandelten Grundkrankheit unterschieden werden können. Eine aktive rheumatoide Arthritis kann z.B. – wie die Behandlung mit GC – eine Osteoporose verursachen. Die Behandlung einer RA mit GC kann also einem Knochenabbau durch die Verminderung Krankheitsaktivität entgegenwirken; gleichzeitig erhöht sich durch die unerwünschte Wirkung des Medikaments das Risiko auf Entstehung einer Osteoporose.[89] Allerdings wird in einer großen Metaanalyse von Espallargues et al. die Einnahme von Corticosteroiden als hoher Risikofaktor für zukünftige Frakturen eingestuft, wogegen eine RA einen mittleren Risikofaktor darstellt.[90] Hatz geht davon aus, dass bei Langzeittherapien mit Dosierungen ≤ 5 mg Prednisolon-Äquivalent/die „eine klinische Wirkung ohne das übliche Nebenwirkungsprofil erreicht“ wird.[7] Wie bereits eingangs erwähnt, deuten neuere Studien jedoch darauf hin, dass bereits geringere tägliche Dosen Osteoporose verursachen können.[13, 14] Die Existenz einer „sicheren Dosierung“ ist daher zweifelhaft. Der erste Teil der

vorliegenden Arbeit sollte die Prävalenz einiger typischer Nebenwirkungen der Glucocorticoidbehandlung bei niedriger Dosierung untersuchen und sie ins Verhältnis zur Effektivität der Kontrolle der Krankheitsaktivität setzen. Außerdem sollte geprüft werden, inwiefern eine möglichst niedrige Dosiseinstellung (mit dem Risiko einer Reaktivierung der Grundkrankheit) sinnvoll ist im Hinblick auf die auftretenden unerwünschten Wirkungen. Hierzu existieren in der Literatur – im Kontrast zu der umfangreichen Anwendung der GC – nur wenige Angaben.

Ein wichtiges Kriterium unserer Studie war, dass gezielt nur Patienten mit Methylprednisolontherapie eingeschlossen wurden. Die Umrechnung der Glucocorticoiddosen auf Prednisolon-Äquivalenzdosen wurde in letzter Zeit häufiger als Vergleichsmaß problematisiert.[9, 48, 52] Hinsichtlich der relativen Wirkpotenz scheint es einen Unterschied für die genomischen und nicht-genomischen Wirkungen zu geben. Dieser Fakt könnte den Vergleich unterschiedlicher GC-Präparate auf Basis der herkömmlichen (genomischen) relativen Wirkpotenzen verfälschen. Da die von uns untersuchten Patienten nur ein Präparat erhielten, ließen sich die Dosierungen tatsächlich exakt vergleichen. Ein weiterer Vorteil der Studie ist, dass es sich bei den untersuchten Personen ausschließlich um Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen und damit um ein sehr homogenes Untersuchungskollektiv handelt.

Als Vergleichsmaßeinheit wählten wir die durchschnittliche tägliche Methylprednisolondosis in den vorausgegangenen zwölf Monaten. Die kumulative Gesamtdosis an Glucocorticoiden ließ sich nicht vollständig erheben, da die Daten hierfür vor dem Beobachtungszeitraum meist inkomplett waren. In der großen Studie von van Staa et al. wurde aber gezeigt, dass die tägliche Dosis relevanter für das Frakturrisiko war als die kumulative Dosis. Es gibt demnach einen monotonen Zusammenhang zwischen täglicher Dosis und Frakturrisiko scheinbar ohne Grenzwert, d.h. linear dosisabhängig. Dieser Zusammenhang war weniger stark ausgeprägt für die kumulative Dosis.[12]

Nach der bereits oben erwähnten standardisierten Nomenklatur für Glucocorticoid-Dosierungen vom August 2002 ist die Grenze für die low-dose GC-Therapie bei 7,5 mg PÄ/die zu ziehen. Alle Patienten in der Dosisgruppe 2 bekamen demnach eine „medium-dose“ GC-Therapie.[61] Schließlich sollte die Untersuchung zur Lebensqualität zeigen, ob Wirkungen und Nebenwirkungen der Therapie in einem angemessenen Verhältnis zueinander stehen.

4.1.1 Unerwünschte Wirkungen

Verminderung der Knochendichte

Folgt man Caldwell et al., ist die GC-induzierte Osteoporose nach Diabetes mellitus und Hautveränderungen eine der häufigsten Nebenwirkungen der low-dose GC-Therapie.[10] Hinsichtlich

der Auswirkungen auf die Lebensqualität des behandelten Patienten ist ihre Bedeutung noch größer. Bei 30 bis 50 % der Patienten, die über längere Zeit mit GC behandelt werden, kommt es zu spontanen oder durch minimale Traumata (sog. „Bagateltraumata“ oder „Niedrigenergetraumata“) ausgelöste Frakturen.[91] Nach van Staa sind 47 % aller Hüftfrakturen und 72 % aller Wirbelfrakturen auf den Gebrauch von Glucocorticoiden zurückzuführen.[92] Wie bereits dargestellt, fällt es schwer, eine feste Dosischwelle für das Auftreten dieser Nebenwirkung auszumachen. Der Übergang ist wahrscheinlich fließend. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich für Methylprednisolon-Dosierungen zwischen 1,58 und 15 mg/die, dass jeweils ca. 1/3 der Patienten normale Werte, eine Osteopenie beziehungsweise eine Osteoporose aufwiesen. Insgesamt über 2/3 der Patienten hatten damit eine signifikante Verringerung der Knochendichte. Diese hohe Zahl relativiert sich etwas, da sich in der untersuchten Gruppe viele postmenopausale Patientinnen befanden. Solche Patientinnen haben per se ein erhöhtes Risiko für eine Osteoporose.[93] Die zwei miteinander verglichenen Dosisgruppen wiesen hinsichtlich der Grundkrankheiten und der weiteren Medikation mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel (z.B. Methotrexat, Bisphosphonate) eine ähnliche Verteilung auf. Auch die Alters- sowie die Geschlechtsverteilung, die ebenfalls Einfluss auf die Knochendichte haben,[68] unterschieden sich nur unwesentlich. In der graphischen Darstellung zeigt sich tendenziell, dass die Gruppe 2 mit der höheren Dosierung eine geringere Knochendichte hat. Die Regressionsgerade fällt sowohl bei der Messung der Lendenwirbelsäule als auch des Schenkelhalses zu höheren durchschnittlichen Dosierungen hin ab. Im Ergebnis zeigte sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden gewählten Dosisgruppen, d.h. nach neuester Nomenklatur zwischen der low-dose und der medium-dose GC-Therapie.

Unsere Ergebnisse können analog der zitierten Autoren interpretiert werden: Der Verlust von Knochendichte mit dem erhöhten Risiko von Frakturen tritt dosisabhängig auch bei niedrigen und niedrigsten Dosierungen von Methylprednisolon auf. Zwischen einer Dosis von im Median 4 mg MP/die und 8,2 mg MP/die lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass ein Grenzwert nicht eindeutig bestimmbar ist, ab dem ein Knochenichteverlust auftritt, da viele individuelle Faktoren einfließen. Es ist allerdings vorstellbar, dass sich bei höheren Patientenzahlen ein eindeutiger statistisch messbarer Unterschied zeigt.

Knochenumsatzparameter

Der Einfluss der Glucocorticoide auf die biochemischen Knochenmarker ist nicht eindeutig. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis führte eine kombinierte Therapie mit Prednisolon, Methotrexat und Sulfasalazin zu einer deutlichen Abnahme sämtlicher Knochenumsatzparameter.

Diese war stärker als bei alleiniger Behandlung mit Sulfasalazin.[89] Die Marker nahmen parallel zur durchschnittlichen BSG ab, was für einen Zusammenhang mit der Grunderkrankung spricht. Die Marker für den Knochenaufbau fielen schneller ab als die für den Knochenabbau, was nach den Autoren eine Erklärung für BMD-Verluste in der Frühphase der Therapie einer rheumatoiden Arthritis mit Glucocorticoiden sein könnte. In dieser Studie von Verhoeven et al. fiel der spinale BMD-Wert nach Therapiebeginn mit Prednisolon ab, während der femorale gleich blieb. Hier vermuteten die Autoren, dass sich GC-induzierte Knochendichteverluste und knochenschützende Effekte durch Reduktion der Krankheitsaktivität die Waage halten.

In unserer Untersuchung zeigte sich zunächst, dass nicht alle Patienten mit verminderter Knochendichte erhöhte Knochenabbauparameter aufwiesen. In diesem Zusammenhang ist zu diskutieren, dass der größte Knochendichteverlust innerhalb des ersten halben Jahres nach Beginn der GC-Therapie zu verzeichnen ist.[54, 58] Danach verläuft der Knochenabbau langsamer oder hält sogar inne. Die Patienten befinden sich also in einem *steady state*, in dem der Knochenaufbau ungefähr dem Knochenabbau entspricht. Somit treten nur unwesentliche Nettoeffekte auf. Da alle in unserer Studie eingeschlossenen Patienten bereits für mindestens ein Jahr die GC-Therapie bekamen, befanden sich vermutlich viele Patienten in diesem Stadium, was die niedrigen Abbauparameter bei einem Teil der Probanden erklären würde. Allerdings zeigten noch 18 Patienten (42,9 %) erhöhte Werte für Pyridinolin und Desoxypyridinolin.

Unter diesen Patienten mit erhöhten Werten wiesen in der Osteodensitometrie fast die Hälfte eine noch normale Knochendichte auf. Nimmt man die gängige Meinung vieler Autoren[69, 74, 76, 77, 78, 79, 80], besteht auch für diese Patienten ein erhöhtes Risiko für Frakturen. Neben dem Risikofaktor „niedrige Knochendichte“ steht der Risikofaktor „erhöhter Knochenumsatz“ als komplementärer Vorhersagewert. Dies würde bedeuten, dass auch bei diesen Patienten der Knochenabbauprozess im Gange ist. Demnach würden fünf Sechstel der Patienten (35 von 42) einen dieser beiden Risikofaktoren für eine Knochenfraktur aufweisen.

Zwischen den beiden Dosisgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Knochenumsatzparameter. Man kann also auch für diesen Wert nicht die Aussage treffen, dass die niedrigere durchschnittliche Dosis (4,11 mg Methylprednisolon/die) sicherer anzuwenden wäre als die höhere (9,04 mg MP/die). Umgekehrt sind demnach 9,04 mg MP/die nicht signifikant schädlicher als 4,11 mg MP/die. Allerdings muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass der Vergleich dadurch erschwert wird, dass sich viele Patienten in beiden Gruppen vermutlich im *steady state* ihres Knochenumbaus befinden.

Weitere unerwünschte Wirkungen

Es gibt sehr wenige Studien, die – jenseits der Osteoporose – die unerwünschten Wirkungen der GC im low-dose Bereich systematisch untersuchen. Häufige unerwünschte Wirkungen waren in unserer Studie: Schmerzen der Wirbelsäule, eine Cushing-Symptomatik, Pergamenthaut und Hautunterblutungen. Seltener traten Striae distensae und ein erhöhter Augeninnendruck auf. Ein Drittel der Patienten gab *Schmerzen in der Wirbelsäule bei Bewegung* an. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Aussage dieser Studie aufgrund der relativ geringen Patientenzahl limitiert ist. Weiterhin muss kritisch angemerkt werden, dass Rückenschmerzen auch durch andere, v.a. degenerative Erkrankungen hervorgerufen werden können. Der Unterschied von neun Patienten (Dosisgruppe 2) versus fünf Patienten (Dosisgruppe 1) mit Bewegungsschmerzen in der Wirbelsäule ist nicht signifikant (p-Wert 0,328). Allerdings zeigten andere Parameter, die auf osteoporosebedingte Schmerzen hindeuten, jeweils die gleiche Tendenz bis hin zu signifikanten Unterschieden. Zusammengefasst sagen sie aus, dass die Schmerzen in der Dosisgruppe 2 größer bzw. weiter verbreitet sind. So gab fast ein Viertel der Patienten in Dosisgruppe 2 osteoporosetypische Schmerzen in Ruhe an, während es in Dosisgruppe 1 mit einem Patienten knapp 5 % waren (p-Wert 0,067). Bei den osteoporosetypischen Schmerzen unter Belastung glichen sich dann die Werte der Gruppen wieder an. Sechs (28,6 %) gegenüber zwei (9,5 %) Patienten hatten eine klopfschmerzhaftige Wirbelsäule. Schließlich zeigte sich bei der Erhebung der Schmerzstärke durch Osteoporose mittels visueller Analogskala ein signifikanter Unterschied zwischen den Dosisgruppen mit geringerer Schmerzintensität in der Dosisgruppe 1. Ob sich bei höherer Fallzahl noch deutlichere Unterschiede darstellen, werden die anschließenden Studien zeigen müssen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Schmerzen bedingt durch steroidinduzierte Osteoporose innerhalb des niedrig dosierten Bereichs unterhalb von 6 mg MP/die seltener auftreten. Mehr als die Hälfte der Patienten hatte eine *Cushing-Symptomatik*, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosisgruppen zeigte. Auch Patienten unterhalb der sog. „Schwellendosis“ (s.o.) für diese Nebenwirkung von 7,5 mg PÄ/die wiesen demnach in hohem Maße eine derartige Fettumverteilung auf. Dies bestätigt die Aussage von Hatz, dass die Dosis für die Entstehung des Cushing-Syndroms individuell unterschiedlich ist.[7] Daher führt der Begriff „Cushing-Schwellendosis“ eher zu Verwirrungen und sollte vermieden werden. Die Fettstoffwechselstörungen waren jedoch meist nicht so stark ausgeprägt, dass sich *Striae distensae* bildeten. Insgesamt zeigten drei Patienten (7,1%) diese unerwünschte Wirkung von MP. Etwa $\frac{3}{4}$ der Patienten wiesen *Hautunterblutungen und Pergamenthaut* auf. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosisgruppen. Die Verdünnung der Haut

sowie die Neigung zu Hautunterblutungen treten bei Methylprednisolonlongabe also bereits bei niedrigsten Dosierungen in großem Umfang auf. Dies bestätigt die Ergebnisse von Caldwell et al., nach denen Hautnebenwirkungen wie Atrophie und Einblutungen unterhalb von 10 mg PÄ/die häufig sind.[10]

Tripathi et al. untersuchten den Einfluss von Glucocorticoiden auf das Glaukomrisiko.[94] Sie bezeichneten danach 18 bis 36 % der allgemeinen Bevölkerung als sogenannte GC-Responder, die auf GC-Gabe mit einer *Erhöhung des Augeninnendrucks* reagieren. Diese Größenordnung wurde in unserer Untersuchung in der oberen Dosisgruppe erreicht. Bei einer durchschnittlichen Dosierung von 9,04 mg MP/die berichteten 5 von 42 Patienten (23,8 %) von einer ophtalmologisch festgestellten Erhöhung des Augeninnendrucks. In der unteren Dosisgruppe (4,11 mg MP/die im Mittel) befand sich nur ein Patient (2,4 %) mit einer solchen Anamnese (p-Wert 0,101). Diese Ergebnisse sind angesichts der relativ kleinen Patientenzahl noch mit Vorsicht zu betrachten. Sie weisen jedoch erstmalig darauf hin, dass es bezüglich des Glaukomrisikos durchaus relevant sein könnte, ob weniger oder mehr als 6 mg MP/die verabreicht werden. Unterhalb von dieser Dosis wäre nach diesen Daten der Gebrauch von MP als relativ sicher im Hinblick auf das Glaukomrisiko anzusehen. Um eine größere Sicherheit für diese Feststellung zu erzielen, müssen jedoch größere Fallzahlen betrachtet werden.

Bei der *Konzentration der Blutfette* zeigte sich, dass die Triglyceride durchschnittlich nicht erhöht waren, während die Gesamtcholesterinwerte im Mittel oberhalb des Empfehlungsbereichs lagen. Statistisch relevante Unterschiede zwischen den Dosisgruppen waren nicht feststellbar. Insgesamt scheinen also die untersuchten Dosierungen keinen relevanten bzw. einen gleichartigen (4,11 mg MP/die wirkt wie 9,04 mg MP/die) Einfluss auf die Blutfette zu haben.

4.1.2 Kontrolle der Krankheitsaktivität

Es existieren bereits einige Studien, die belegen, dass niedrig dosierte GC die Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen wirksam kontrollieren können.[1, 8, 10, 89, 95, 96, 97, 98] In unserer Untersuchung bewegten sich die Aktivitätsparameter der Grundkrankheiten überwiegend im gut kontrollierten Bereich. Unter der niedrig dosierten Methylprednisolontherapie und ggf. mit Sekundärmedikation zeigte sich meist keine Exazerbation des entzündlich-rheumatischen Leidens. Es ließen sich allerdings Ausnahmen beobachten.

Die Aktivitätseinschätzung mittels VAS fiel durch den behandelnden Arzt meist geringer aus als durch die Patienten (jeweils ca. 20 mm in beiden Dosisgruppen bei Einschätzung durch den Arzt; 48 mm [Dosisgruppe 1] und 37 mm [Dosisgruppe 2] bei Einschätzung durch die Patienten). Diese Diskrepanz lässt sich durch die unterschiedlichen Bewertungsgrundlagen von Arzt und Patient

erklären. Der Arzt stützt sich auf die klinische Untersuchung sowie die Laborparameter. Der Patient / die Patientin bewertet vermutlich mehr seinen / ihren allgemeinen Gesundheitsstatus oder die Einschränkung durch die Erkrankung, die nicht notwendigerweise durch eine aktuell hohe entzündliche Aktivität verursacht wird (z.B. irreversible Gelenkschäden etc.). Diese Hypothese müsste in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Nimmt man die Aktivitätseinschätzung durch den behandelnden Arzt (jeweils ca. 20 mm von 100 mm), so bewegte sich die Aktivität der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen in beiden Dosisgruppen im unteren Bereich. Die Entzündungsparameter BSG und CRP waren mit im Mittel 25,4 mm/1. Stunde bzw. 1,02 mg/dl nicht stark erhöht (Normwerte für BSG: Frauen: bis 50 Jahre < 20 mm/1. h, ab 50 Jahre < 30 mm/1. h; Männer: bis 50 Jahre < 15 mm/1. h, ab 50 Jahre < 20 mm/1. h – Normwert für CRP: < 0,50 mg/dl). Allerdings zeigten neun Patienten (21,4 %) eine BSG > 30, ein Patient hatte einen Wert größer 50 mm/1. Stunde. Auch für die CRP-Konzentrationen gab es in fünf Fällen Werte, die mit > 2 mg/dl klar erhöht waren. Hier fand sich ein Spitzenwert von 6,49 mg/dl. Bei diesem Patienten zeigte sich gleichzeitig eine moderate Erhöhung der BSG von 25 mm/1. Stunde. Für keinen Krankheitsaktivitätsparameter konnte ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Dosisgruppen errechnet werden. Dies lässt sich so interpretieren, dass die Patienten im Wesentlichen die jeweils adäquate Dosierung ihrer antientzündlichen Therapie bekamen. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse so interpretieren, dass die low-dose GC-Therapie mit Methylprednisolon in der Lage ist, entzündlich-rheumatische Erkrankungen im Sinne einer Co-Medikation wirksam zu kontrollieren; es besteht jedoch ein labiles Gleichgewicht zwischen anti-entzündlicher Therapie und entzündlicher Aktivität des Körpers, das einer regelmäßigen Kontrolle bedarf, da in Einzelfällen Exazerbationen vorkommen können.

4.1.3 Befragung zur Lebensqualität

Der Short-Form 36 Fragebogen

Wir verwendeten den Short Form-36 Fragebogen zur Evaluierung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Nach Bullinger et al. bezeichnet dieser Begriff ein psychologisches Konstrukt aus mindestens vier Komponenten: psychisches Befinden, körperliche Verfassung, soziale Beziehungen und funktionale Kompetenz der Befragten.[87] In der Ermittlung der Lebensqualität sollen neben klassischer Zielkriterien wie Verbesserung der Symptomatik und erhöhte Lebenserwartung auch die psychischen und sozialen Komponenten des Gesundheitsbegriffs (nach WHO-Definition)[99] einbezogen werden. Zudem sollen die Auswirkungen von Krankheit und Therapie auf die Patienten erfasst werden. Hieraus werden dann auch Rückschlüsse auf den Behandlungsbedarf erwartet.

Die Auswertung der Fragebögen erfolgte gemäß der Handanweisung für den SF-36 von Bullinger und Kirchberger.[87] Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Interpretation des SF-36. Eine ist der Vergleich der Patienten zu Referenzgruppen innerhalb derselben Erkrankung oder in Bezug auf eine gesunde Vergleichsgruppe. Die deutsche Normstichprobe, zu der wir unsere Ergebnisse ins Verhältnis setzten, ist charakterisiert durch ein Durchschnittsalter von 47,7 Jahren und einen Frauenanteil von 55,6 %. Das durchschnittliche Alter war in unserem Patientenkollektiv mit 52 Jahren nur geringfügig höher. Da in unserer Untersuchung der Anteil der Frauen mit 83,3 % deutlich größer war, setzten wir diese Ergebnisse auch getrennt ins Verhältnis zur weiblichen und männlichen deutschen Normstichprobe. Die Auswertung des SF-36 ermöglicht die standardisierte Ermittlung sogenannter Summenskalen für körperliche und psychische Kategorien. Mit diesen Summenskalen ist eine Differenzierung der Aussagen zu der gesundheitsbezogenen Lebensqualität in die psychischen und physischen Komponenten möglich.

Anhand unserer Ergebnisse konnten wir keinen signifikanten Unterschied der Lebensqualität zwischen der unteren und der oberen Dosisgruppe feststellen. Innerhalb der low-dose und der medium-dose Glucocorticoidtherapie ist die Dosishöhe also offensichtlich kein ausschlaggebender Faktor für die Lebensqualität.

Im Vergleich des gesamten Patientenkollektivs mit der Normalstichprobe fällt auf, dass sich Differenzen vor allem bei den physischen Kategorien wie Schmerzen oder der physischen Funktion zeigen. Bei den sozio-emotionalen Kategorien wie dem psychischen Wohlbefinden oder der sozialen Funktionsfähigkeit stellen sich die Testwerte näher an denen des gesunden Kontrollkollektivs dar. Dies verdeutlicht der Vergleich der körperlichen und psychischen Summenskalen. Hier fällt der Unterschied bei der körperlichen Summenskala wesentlich deutlicher aus. Trotz einer deutlichen körperlichen Beeinträchtigung scheint also das psychische und soziale Befinden i.d.R. nur wenig alteriert zu sein. Dies deckt sich größtenteils mit Ergebnissen bei Populationen von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Auch bei diesen ist das körperliche Befinden deutlich stärker eingeschränkt als das psychosoziale.[100]

4.1.4 Zusammenfassung

Wir verglichen in der durchgeführten Studie zwei Patientengruppen mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen mit zwei unterschiedlichen mittleren Dosierungen von Methylprednisolon. Nach neuester Nomenklatur[61] beinhaltete die Dosisgruppe 1 Patienten mit einer low-dose GC-Therapie, während die Dosierungen der Dosisgruppe 2 einer niedrigen medium-dose Therapie entsprachen. Die Patienten erhielten diese Dosen über mindestens ein Jahr, befanden sich also im *steady state* bzgl. der Wirkungen / Nebenwirkungen. Dies bestätigt die

insgesamt gut kontrollierte Krankheitsaktivität. Hinsichtlich der unerwünschten Wirkungen ließen sich kaum statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestimmen. Bei folgenden Symptomen ließ sich allerdings eine Tendenz bzw. eine statistische Signifikanz hinsichtlich einer verstärkten Ausprägung in der Dosisgruppe 2 erkennen: Verringerung der Knochendichte, osteoporosetypische Rückenschmerzen und erhöhter Augeninnendruck. Es ist bei diesen Symptomen vorstellbar, dass bei einer größeren Patientenzahl statistisch relevante Unterschiede erkennbar werden. Für diese unerwünschten Wirkungen wäre es dann besonders sinnvoll und notwendig, die mittlere tägliche Dosis von Methylprednisolon innerhalb des untersuchten Bereichs so weit wie möglich zu reduzieren. Unabhängig von der Dosierung traten als sehr häufige Nebenwirkungen Verdünnungen und Unterblutungen der Haut sowie eine Cushing-Symptomatik auf.

Die Therapie war in den meisten Fällen offenbar geeignet für die Kontrolle der Krankheitsaktivität. In Einzelfällen waren jedoch hohe Entzündungswerte nachweisbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine niedrig dosierte GC-Therapie regelmäßig überwacht und die Dosierung ggf. angepasst werden muss.

Die gesundheitsbezogene Lebensqualität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Dosisgruppen. Es ist auffallend, dass die physische Lebensqualität deutlich stärker eingeschränkt ist als die psychosoziale im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation.

4.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren

Der Nachweis von mGCR gelang bis dato bei neuronalen Membranen von Amphibienhirnen,[39, 40, 46, 101] auf Lymphomzellen von Ratten und Menschen[43, 44] sowie kürzlich auf humanen PBMC.[45] Auch bei Rattenleberzellen wurden spezifische Membranbindungsstellen für Glucocorticoide nachgewiesen.[102] Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Unsere Experimente sollten dazu dienen, die Expression der mGCR auf PBMC genauer zu untersuchen, um weitere Erkenntnisse zu diesen Rezeptoren zu gewinnen.

Verschiedene Signalsysteme (Ca^{2+} , IP_3 , PKC, cAMP, DAG, MAPK, G-Proteine) wurden mit der spezifischen Membranbindung anderer Steroidmoleküle in Verbindung gebracht. Aldosteron und Fludrocortison bewirkten einen IP_3 -Anstieg binnen 30 s in menschlichen PBMC.[103] In glatten Muskelzellen bewirkte Aldosteron den Anstieg von PKC und DAG.[30] Aldosteron verursachte ebenso wie an Rinderserumalbumin gekoppeltes Testosteron einen schnellen Ca^{2+} -Anstieg in glatten Muskelzellen bzw. Mauslymphozyten.[35, 104] Dies schien jeweils auf eine IP_3 - und DAG-Bildung zurückführbar zu sein. In glatten Muskelzellen von Schweinen führte Aldosteron innerhalb von einer Minute zu einem cAMP-Anstieg.[105] Nach Borski gibt es mittlerweile gute Hinweise dafür, dass auch GC cAMP und Ca^{2+} als Signalübertragungswege benutzen.[106] Sie führten im Gegensatz zu anderen Steroidhormonen zu verringerten intrazellulären cAMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen.[107] Buttgeriet et al. zeigten die Hemmung eines schnellen Ca^{2+} -Einstroms in Rattenthymozyten durch Methylprednisolon.[50] Borski stellte ein hypothetisches Modell auf, wonach mGCR einerseits über G-Proteine die Adenylatzyklase hemmen und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration senken. Andererseits stimulierten die G-Proteine die PKC sowie Einwärts-Gleichrichter- K^+ -Kanäle. Dadurch werde der transzelluläre Ca^{2+} -Einstrom gehemmt. Wie die mGCR die G-Proteine aktivieren sollen, bleibt dabei noch unklar. Der Autor stellte die Vermutung auf, dass intrazelluläre GCR an G-Proteine koppeln könnten. Hafezi-Moghadam et al. berichteten kürzlich über die kardiovaskulär protektiven Effekte von Dexamethason, u.a. vermittelt über die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Diese Effekte konnten nicht durch genomische (da sie zu schnell eintraten und nicht durch Actinomycin D hemmbar waren) und unspezifische nicht-genomische Wirkungen (da sie bereits ab Konzentrationen von 100 nM auftraten) erklärt werden.[53] Ebenfalls kürzlich fanden Solito et al., dass die Translokation von Annexin 1 zur Zellmembran durch Dexamethason in humanen Follikelzellen unter anderem durch nicht-genomische Wirkungen verursacht wurde. Diese konnten durch Blockade der PKC sowie des MAPK-Pfades inhibiert werden.[108] Cato et al. beschrieben schnelle GC-

Wirkungen, die durch transmembranöse Rezeptoren vermittelt und insensitiv gegenüber klassischen Steroidantagonisten waren. Sie postulierten, dass es zwei verschiedene Arten von membranständigen Rezeptoren für Steroide gebe: membrangebundene Steroidrezeptoren und membran-assoziierte Rezeptoren, die keine klassischen Steroidrezeptoren sind. Nach den Autoren unterschieden sich die ersten von den zweiten u.a. dadurch, dass sie sich mit monoklonalen Antikörpern gegen klassische Steroidrezeptoren identifizieren ließen.[109]

Wir nutzten zum Nachweis von membranständigen und zytosolischen GCR einen murinen monoklonalen Antikörper, der gegen einen 26 Aminosäuren langen konservierten Bereich des zytosolischen Glucocorticoidrezeptors (Abb. 2) gerichtet ist. Berki et al. gelangen damit der spezifische Nachweis zytosolischer GCR in humanen PBMC.[81] Gametchu et al. nutzten ebenfalls monoklonale Antikörper gegen den zytosolischen Rezeptor, um membranständige Rezeptoren nachzuweisen.[43, 44] Die Tatsache, dass sich mGCR durch Antikörper gegen iGCR spezifisch detektieren lassen, weist auf die Ähnlichkeit dieser Proteine hin. Es gibt eine Kontroverse darüber, ob es sich bei dem mGCR um eine Variante des iGCR handelt, oder ob es ein vollkommen anderes Protein ist (siehe Kapitel 1.1.). Diese Diskussion wird auch bei anderen membranständigen Steroidrezeptoren geführt.[47] In mit Genen für Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) transfizierten Ovarialzellen von chinesischen Hamstern wurde gezeigt, dass ER sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran nachweisbar waren. Der Anteil der membranständigen ER an der Gesamtzahl der ER war mit 2 % (ER β) bzw. 3 % (ER α) sehr gering.[110] Unklar bleibt, wie die Rezeptoren an die Membran gebunden werden, da der zytosolische ER keine typische transmembranöse Domäne aufweist.[47]

Für die Aufklärung der Funktion wird letztlich die Klonierung des mGCR nötig sein, die bisher noch nicht gelang.

Die durchflusszytometrische Detektion von Zelleigenschaften wie Größe und Granularität sowie von immunfluoreszenten monoklonalen Antikörpermarkierungen stellt eine wichtige Methode zur Charakterisierung und Erkennung von Zellen dar. Wir koppelten die *anti*GCR-Antikörper mit unterschiedlichen Molekülen, die antigene oder fluoreszierende Eigenschaften haben. Die Fluoreszenz dieser Moleküle kann im Durchflusszytometer detektiert werden; darüber hinaus können sie Epitope für weitere Färbeantikörper (Sekundärreagenzien) darstellen. Die Verwendung von Sekundärreagenzien dient vor allem der Verstärkung des Färbesignals. Lässt sich das Färbesignal durch Vorinkubation mit nicht fluoreszenzgekoppeltem (unmarkiertem) Antikörper deutlich reduzieren, spricht dies für eine spezifische Färbung. Die spezifischen Bindungsstellen sind dann durch die unmarkierten Antikörper besetzt, die markierten binden nicht unspezifisch an anderen Bindungsstellen. Ein weiterer Test für die Spezifität der Färbung ist die Vorinkubati-

on des Antikörpers mit dem Peptid, das für deren Herstellung verwendet wurde. Dadurch soll die Bindungsstelle am Antikörper besetzt und gezeigt werden, dass nicht andere (unspezifische) Teile des Molekülkomplexes an Zellstrukturen binden (epitopspezifischer Block).

Zur Etablierung des Färbesystems sollte gewährleistet werden, dass die unspezifische Färbung möglichst gering gehalten wird. Bei dem zunächst verwendeten Färbesystem für die Oberflächenfärbung *antiGCR-FITC* → *antiFITC-Dig* → *antiDig-Liposomen* war die unspezifische Färbung noch zu hoch. Daher koppelten wir die *antiGCR-AK* direkt mit Digoxigenin. Das nun verwendete Färbesystem *antiGCR-Dig* → *antiDig-Liposomen* zeichnete sich durch eine deutlich geringere unspezifische Färbung und sehr gute Reproduzierbarkeit aus.

Der spezifische Nachweis von zytosolischen GCR wurde, wie bereits erwähnt, mehrfach beschrieben.[43, 45, 81] Da diese in hoher Anzahl in den Zellen vorliegen, sind sie auch mit konventioneller Fluoreszenzfärbung detektierbar. Man geht heute von 3000 – 6000 GCR-Molekülen pro weißer Blutzelle aus.[111, 112, 113] Die Sensitivitätsminimum liegt für die konventionelle Färbung bei ca. 2000 Molekülen pro Zelle.[83]

Zum Nachweis der iGCR verwendeten wir die CCRF-CEM-Zelllinie. Als Sekundärreagenz diente ein *antiDig-Cy5-AK*, der gegen den Digoxigenin-Rest des *antiGCR-Dig-AK* gerichtet war. Durch den Nachweis der iGCR wurde die Sensitivität und Spezifität des Färbesystems gezeigt. Die Färbung der Zellen durch Markierung der Rezeptoren war spezifisch, da sich das Signal durch Vorinkubation mit unmarkierten Antikörpern bzw. mit dem Rezeptor-Epitop APTEK26 deutlich reduzieren ließ. Den eindeutigen Block bestätigte die Differenz in der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI), die nach Blockade wieder dem Ausgangswert entsprach (Abb. 17).

Für den Nachweis der mGCR verwendeten wir ebenfalls zunächst die CCRF-CEM-Zelllinie. Auf diesen T-Lymphoblasten wies Gametchu erstmals mGCR auf humanen Zellen nach. Dies gelang ihm allerdings erst nach vorheriger immunabsorptiver Rezeptoranreicherung.[43, 44] Mit dem konventionellen Färbesystem *antiGCR-Dig* → *antiDig-Cy5* ließen sich in unseren Experimenten keine mGCR-positiven Zellen detektieren. Auch Berki et al. erhielten mit den gleichen *antiGCR-AK* keine Färbung, wenn sie der Inkubationslösung kein Saponin zusetzten und damit eine Oberflächenfärbung vornahmen.[81] Als Grund hierfür diskutierten wir zwei Möglichkeiten: 1. Der mGCR wird von einem anderen Gen kodiert als der iGCR. Es resultiert daraus ein anderes Protein, das nicht von dem verwendeten Antikörper erkannt wird. 2. Die Expressionsdichte der Rezeptoren an der Zelloberfläche ist sehr gering und liegt unter dem Detektionslimit der konventionellen Färbemethode. Bei der konventionellen Färbung werden in der Regel zwischen 10 und 50 Fluoreszenzmoleküle an den monoklonalen Antikörper gekoppelt. Eine hohe

Anzahl an Fluoreszenzmolekülen führt dabei auch zu einer verstärkten unspezifischen Färbung durch hydrophobe Interaktionen mit der Zelle.[82] Bei weniger als 2000 Antigenmolekülen pro Zelle wird das Signal dann zu gering, um im Durchflusszytometer detektiert zu werden.[83] Dabei ist bekannt, dass zum Beispiel Zytokin- und prä-T-Zellrezeptoren bereits in einer Anzahl von ca. 100 Molekülen pro Zelle physiologische Wirkungen erzielen.[114, 115]

Um die 2. Hypothese zu überprüfen, wendeten wir eine hochempfindliche Immunfluoreszenzfärbung mit magnetofluoreszenten Liposomen zur Detektion der mGCR an. Diese Färbemethode erlaubt durch an Antikörper gekoppelte, mit Fluoreszenzmolekülen gefüllte Liposomen eine 100 – 1000fache Verstärkung des Signals gegenüber der konventionellen Färbung. Damit wird der Nachweis von Oberflächenantigenen ab einer Zahl von wenigen hundert Molekülen pro Zelle ermöglicht.[83, 85] Bei sehr geringer Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle ist die Färbung nicht mehr quantitativ. Es kann also detektiert werden, ob eine Zelle das jeweilige Molekül an ihrer Oberfläche exprimiert, nicht aber in welcher Zahl. Ab dem Detektionslimit wird die Zelle positiv für die Rezeptoren erkannt, darunter negativ. Daher ist die Angabe der MFI bei der Liposomenfärbung von in geringer Zahl exprimierten Oberflächenmolekülen nicht sinnvoll. Die Färbehelligkeit wird nicht gleichmäßig geblockt, da schon durch die Färbung einer Zelle mit nur wenigen Liposomen diese sehr hell detektiert wird. Daraus ergibt sich allerdings auch die folgende offene Frage: Handelt es sich bei den mGCR-positiven Zellen um eine distinkte Subpopulation, die ausschließlich die Rezeptoren exprimiert; oder findet eine Expressionssteigerung unter bestimmten Umständen bei allen Zellen statt, und wird nur die „Spitze des Eisberges“ (die Zellen, die am meisten mGCR exprimieren) erkannt? Diese Frage wird später noch einmal aufgegriffen werden.

Mit den FITC-gefüllten, *anti*Digoxigenin-AK-gekoppelten Liposomen ließen sich mGCR auf den CCRF-CEM-Zellen detektieren. Durchschnittlich fast 11 % der Zellen waren positiv für mGCR. Da stets mehr als 8 % der CCRF-CEM-Zellen positiv für mGCR waren, nutzten wir diese Zelllinie als Positivkontrolle in den weiteren Experimenten.

4.2.1 Nachweis von mGCR auf humanen PBMC

Gesunde Probanden

Kürzlich konnten erstmals mGCR auf Monozyten und Lymphozyten von phänotypisch gesunden humanen Spendern nachgewiesen werden.[45] Wir führten nun mit optimierter Technik zum ersten Mal eine systematische Untersuchung gesunder Individuen durch und differenzierten die Lymphozyten nach B- und T-Lymphozyten. Letzteres erreichten wir durch Detektion spezifischer Antigene mit monoklonalen Antikörpern (*anti*CD3 für T-Lymphozyten, *anti*CD19 für B-

Lymphozyten, *antiCD14* für Monozyten) in der Durchflusszytometrie. Es konnte gezeigt werden, dass jeweils ein Prozentsatz von 0,2 – 5 % bei den B-Lymphozyten und 3 bis 7,2 % bei den Monozyten mGCR exprimieren. Dagegen gelang kein Nachweis auf T-Lymphozyten.

Interessanterweise veränderte sich die Expression der Rezeptoren mit bestimmten Krankheitssymptomen. So wiesen Personen mit vorangegangenen grippalen Infekt ebenso eine erhöhte Anzahl mGCR-positiver Zellen auf wie solche mit akuter Arthritis und Tonsillitis. Dies war sowohl bei den B-Lymphozyten als auch bei den Monozyten der Fall. Dieser auffällige Befund ließ uns die Frage stellen, womit diese vermehrte Expression zusammen hängt. Wir hatten die Vermutung, dass eine Aktivierung des Immunsystems eine erhöhte Anzahl mGCR-positiver Zellen bewirkt.

Probanden nach Hepatitis B-Impfung

Wir untersuchten nun zwei Probanden systematisch auf die Ausprägung von mGCR vor und nach einer Hepatitis B-Impfung. Die Impfung ist ein standardisierter Immunstimulus, der unter anderem zur Bildung von spezifischen Antikörpern und Gedächtniszellen führt. Es sollte untersucht werden, inwiefern ein solcher Immunstimulus die Expression von mGCR auf PBMC beeinflusst.

Während sich die Werte vor und drei Tage nach der Impfung in dem Bereich bewegten, den wir bei anderen gesunden Probanden gefunden hatten, zeigte sich nach einer Woche ein deutlicher Anstieg auf das drei- bis vierfache des Ausgangswertes.

Bei den *Monozyten* waren bis zu einem Fünftel der Zellen positiv für die Rezeptoren, zuvor waren es ca. 5 %. Der Verlauf der Expression war bei beiden Probanden sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass der Abfall auf die Ausgangswerte verschieden lange dauerte. Die Beobachtung erhöhter mGCR-Expression auf Monozyten nach Infekten könnte eine Erklärung für den langsameren Abfall der Werte eines Probanden darstellen. Dieser hatte nach eigenen Angaben eine „heftige Grippe“ zwölf Tage nach der Impfung.

Bei den *B-Lymphozyten* war der initiale steile Anstieg ebenfalls zu beobachten. Der Abfall der Werte erfolgte jedoch rascher, um nachfolgend wieder anzusteigen. Dieser Anstieg war bei beiden Probanden zu verzeichnen, wenn auch in stärkerem Ausmaß bei jenem mit grippalem Infekt. Allerdings war hier kein direkter zeitlicher Zusammenhang zu erkennen.

Bei den *T-Lymphozyten* zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine mGCR-Expression.

Bemerkenswert ist der synchrone Anstieg der Messwerte bei beiden Probanden circa eine Woche nach dem „Stimulus“ und der über Wochen andauernde langsame Abfall zu den Ausgangswerten. Auch wenn für diese Arbeit nur zwei Probanden untersucht wurden und eine systematische Untersuchung an einer größeren Anzahl noch aussteht, legen diese Ergebnisse nahe, dass mit der

Impfung die Expression der mGCR auf Monozyten und B-Lymphozyten stimuliert wurde. Die Diskussion zu der möglichen Funktion dieser erhöhten Expression der mGCR wird auf Seite 79ff geführt.

Patienten mit rheumatoider Arthritis

Die vorausgegangenen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung des Immunsystems zu einer erhöhten Expression der mGCR führt. Mit der Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis wollten wir feststellen, ob sich die Expression von mGCR auf PBMC mit der Krankheitsaktivität verändert. Es sollte für die rheumatoide Arthritis der Zusammenhang zwischen dem *Grad der immunologischen Aktivität* und der *mGCR-Expression* untersucht werden. Die Expression von mGCR könnte dabei Hinweise auf mögliche nicht-genomische Wirkmechanismen bei der Behandlung der RA mit Glucocorticoiden geben.

Die RA ist eine entzündlich-rheumatische Erkrankung, die sehr häufig mit GC behandelt wird. Dabei werden je nach Krankheitsaktivität sehr hohe bis hin zu sehr niedrigen Dosen erfolgreich angewandt.[1, 2, 3, 4, 97] Wir wählten die RA aus, weil sie sich sehr gut hinsichtlich der Krankheitsaktivität charakterisieren lässt. Um ein einheitliches Kollektiv an untersuchten Personen zu erhalten, sollte nur eine entzündlich-rheumatische Grundkrankheit betrachtet werden. Sämtliche Patienten hatten eine gesicherte RA nach ARA-Kriterien.[116] Für die Bestimmung der Krankheitsaktivität dienten diverse objektive (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein, Anzahl druckschmerzhafter und geschwollener Gelenke) und subjektive (Krankheits- und Schmerzcharakterisierung mittels visueller Analogskala) Einzelparameter, außerdem der berechnete Disease Activity Score (DAS), der einige dieser Parameter standardisiert zusammennimmt. Grundsätzlich fanden wir bei den meisten Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöhte Werte mGCR-positiver Monozyten, teilweise auch der B-Lymphozyten. Einige Patienten wiesen aber auch „Normalwerte“ auf (verglichen mit denen gesunder Spender).

Die Maximalwerte der *Monozyten* waren mit fast 20 % deutlich erhöht, auch der durchschnittliche Wert war mit gut 10 % mehr als doppelt so hoch wie bei Gesunden. Die Korrelation der Krankheitsaktivitätsparameter mit der Anzahl mGCR-positiver Monozyten im Blut der Patienten zeigte in der überwiegenden Zahl der Fälle einen signifikanten Zusammenhang, der auf die folgende Formel gebracht werden kann: je höher die Aktivität der rheumatoiden Arthritis, umso höher die Zahl mGCR-positiver Monozyten. Dieser Zusammenhang war bei den einzelnen Parametern mehr oder weniger stark ausgeprägt. Bei der Anzahl der geschwollenen Gelenke sowie der Selbsteinschätzung des allgemeinen Gesundheitszustandes durch den Patienten zeigte sich keine signifikante Korrelation. Die höchsten Werte für die Korrelationskoeffizienten wurden bei

den Parametern erreicht, die wahrscheinlich am besten ein Gesamtbild der Krankheitsaktivität wiedergeben. Es sind dies der DAS und die Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Arzt. Der DAS wird von einigen Autoren auch als Goldstandard für diesen Zweck bezeichnet.[86] Die Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den behandelnden Arzt bekommt zwar durch die visuelle Analogskala eine gewisse Unschärfe und Subjektivität, beinhaltet aber den klinischen Gesamteindruck des Arztes nach der Untersuchung. In beiden Fällen ist der Korrelationskoeffizient mit 0,808 bzw. 0,891 sehr hoch (p-Wert für den Zusammenhang 0,001 bzw. 0,0002). Für die *B-Lymphozyten* lässt sich dieser Zusammenhang nicht erkennen. Hier schwankten die Werte unabhängig von der Krankheitsaktivität. Auch bei Patienten mit hohem Anteil mGCR-positiver Monozyten fanden sich geringe Anteile mGCR-positiver B-Lymphozyten und umgekehrt. Der durchschnittliche Wert sowie der Median waren erhöht gegenüber den gesunden Probanden (Mittelwert: 4,15 % gegenüber 2,79 %; Median 3,77 gegenüber 2,64 %). Der Maximalwert von 9,89 % war ebenfalls deutlich über dem der Gesunden (5,04 %). Auch bei den zwei gesunden Probanden mit kürzlich zurückliegender Krankheit waren die Werte mit 8,09 bzw. 7,54 % erhöht. Bei der dritten Person waren sie mit 0,98 % dagegen sehr niedrig. Es wäre denkbar, dass die Expression der mGCR auf B-Lymphozyten einer anderen Kinetik folgt als die auf den Monozyten. Bei den Hepatitis-B geimpften Probanden zeigte sich, dass nach einem Anstieg parallel zu dem der Monozyten die Werte der mGCR-positiven B-Lymphozyten schnell wieder abfielen. Sie stiegen erneut an, als die Werte der Monozyten am Abfallen waren. Es wäre möglich, dass diesem Phänomen eine „Phasenverschiebung“ in der mGCR-Expression auf B-Lymphozyten und Monozyten zugrunde liegt. In unterschiedlichen Phasen der Immunreaktion würden demnach unterschiedliche immunkompetente Zellen mGCR exprimieren.

Bei der Patientin mit *akutem Schub eines systemischen Lupus erythematoses* befand sich die mGCR-Expression auf den B-Lymphozyten mit 2,77 % ebenfalls im Bereich der gesunden Spender. Hier differierte der Anteil der positiven Monozyten sehr stark von dem der B-Lymphozyten. Mit 36,76 % war es der am höchsten gemessene Wert in allen Experimenten. Wir untersuchten die Patientin spontan, da sie mit hoher Krankheitsaktivität in unsere Klinik aufgenommen wurde. Sie hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits einige Stunden zuvor einen Prednisolon-Stoß (100mg) erhalten. Der hohe Anteil mGCR-positiver Monozyten lässt sich gut mit der hohen entzündlichen Aktivität der Grundkrankheit im Rahmen der vorausgegangenen Beobachtungen *hohe immunologische Aktivität → hohe mGCR-Expression auf Monozyten* interpretieren.

Diese Experimente zeigen erstmals systematisch die physiologische Expression von mGCR so-

wie deren Kinetik auf humanen Immunzellen. Neu ist auch, dass die Expression der mGCR auf Monozyten offensichtlich abhängig von grippalen Infekten, Booster-Impfungen oder der Krankheitsaktivität einer rheumatoiden Arthritis ist. Exprimiert werden diese Rezeptoren auf B-Lymphozyten und Monozyten, nicht jedoch auf T-Lymphozyten und Granulozyten.

Bei anderen membranständigen Steroidrezeptoren scheint es ebenfalls so zu sein, dass nicht alle Zellen diese exprimieren, wie das beim fast ubiquitär vorkommenden zytosolischen GCR der Fall ist. Benten et al. fanden interessanterweise kürzlich, dass T-Lymphozyten und Makrophagen, nicht aber B-Lymphozyten membranständige Östrogen- und Testosteronrezeptoren exprimieren.[34]

Die CCRF-CEM-Zelllinie ist allerdings ein T-Zellklon *und* exprimiert mGCR. Ein relevanter Unterschied könnte sein, dass es sich um T-Lymphoblasten handelt. Bei unseren Experimenten waren die T-Lymphozyten auch bei hohem mGCR-positiven Anteil in den anderen Zellpopulationen stets negativ. Es stellt sich die Frage, ob T-Lymphozyten unter bestimmten Stimuli mGCR exprimieren können, oder ob es eine Eigenart der konkreten Tumorzelle ist. Ebenfalls gilt es zu klären, wodurch die Kinetik der Expression zustande kommt und warum diese bei B-Lymphozyten anders ist als bei Monozyten. An dieser Stelle kann an die weiter oben gestellte Frage angeschlossen werden, ob ausschließlich eine Subpopulation der B-Lymphozyten oder Monozyten mGCR exprimieren, oder ob dies alle Zellen in geringer Zahl tun oder zumindest potentiell dazu in der Lage sind. Die mER-positiven Zellen können diese Eigenschaft offensichtlich im Zuge einer weiteren Zellkultivierung wieder verlieren.[117] Gametchu et al. fanden eine Abhängigkeit der mGCR-Expression auf CCRF-CEM-Zellen von dem Zellzyklus.[44] Deshalb untersuchten wir die Kinetik der mGCR-Expression auf diesen Zellen nach Auftauen und fanden, dass die Expression nach ca. 40 h am höchsten war und nachfolgend wieder abfiel. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die membranständigen Rezeptoren abhängig vom jeweiligen Zellstadium exprimiert werden, was wiederum gegen die Existenz einer distinkten mGCR-positiven Subpopulation spricht. Entsprechend könnte sich der Aktivierungsgrad einer Zellpopulation (z.B. der Monozyten durch einen Immunstimulus) auf die Expression der mGCR auswirken. Mit der Aktivierung würde dann die mGCR-Expression auf einigen Zellen über die Detektionsschwelle von ca. 200 Rezeptoren pro Zelle ansteigen, wodurch diese Zellen positiv für mGCR erkannt würden. Nach dieser Überlegung wäre es möglich, dass auch die T-Lymphozyten mGCR in geringer Anzahl exprimierten. Es wäre denkbar, dass ein adäquater Stimulus auch bei diesen Zellen die Ausprägung der mGCR über das Detektionslimit der Liposomenfärbung anheben könnte.

Nachfolgende Untersuchungen sollen nun prüfen, ob eine *in vitro*-Stimulation von Monozyten

mit Lipopolysaccharid eine ähnliche Expressionssteigerung der mGCR bedingen kann.

Hinsichtlich der Funktion der mGCR bedarf es noch weiterer Forschung.

Denkbar wäre eine Funktion im Sinne eines negativen Feed-back-Mechanismus (z.B. durch Apoptoseinduktion), der eine überschießende Immunantwort verhindern soll. Ein Beispiel für einen vermuteten derartigen negativen Feed-back-Mechanismus ist der bereits erwähnte Zusammenhang zwischen Plasma-Cortisol und ACTH-Ausschüttung.[22] Gametchu et al. beobachteten eine Zerstörung von Lymphomzellen (CCRF-CEM) nach Glucocorticoidapplikation.[43, 44] Nach Verringerung der Zellsubpopulation, auf der zuvor die mGCR nachgewiesen worden waren, zeigten die Lymphomzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber der Glucocorticoid-induzierten Zelllyse. Die mGCR-angereicherten Zellen waren sensibler für GC-induzierten Zelltod. Die absolute Zahl an GC-Bindungsstellen war dabei nicht relevant für eine klinische Antwort im Sinne eines Absterbens der Zellen. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die mGCR eine Schlüsselrolle bei der GC-induzierten Apoptose spielen. Sowohl Ca^{2+} und cAMP als auch die PKC wurden in lymphoiden Mauszellen mit der GC-induzierten Apoptose in Verbindung gebracht.[118, 119] Dies lässt sich nach den oben genannten Ergebnissen und Hypothesen mit einer schnellen GC-Wirkung über mGCR vereinbaren. In diesem Zusammenhang wäre vorstellbar, dass die Immunantwort durch eine verstärkte Apoptoseneigung der immunkompetenten Zellen limitiert wird. Allerdings wäre dies nach unseren Ergebnissen nicht für die T-Lymphozyten der Fall. Die Induktion von Apoptose könnte allerdings auch über genomische Mechanismen verursacht sein.[120, 121] Schließlich könnten auch unspezifische nicht-genomische Wirkungen dafür verantwortlich sein, indem sie die mitochondriale Funktion beeinträchtigen.[122] Dagegen demonstrierten Kousteni et al. schnelle *antiapoptotische* Effekte durch Androgene und Östrogene u.a. bei Osteoblasten, Osteozyten und embryonalen Fibroblasten.[123]

Eine andere Hypothese zu der Funktion der mGCR ist, dass sie eine Rolle in der Pathogenese von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen spielen. Diese Hypothese begründet sich auf unseren Untersuchungsergebnissen bei Patienten mit RA. Hier zeigte sich bei den Monozyten, dass die Aktivität der Erkrankung mit dem Anteil mGCR-positiver Zellen korrelierte.

Nach Cato et al. ist eine Funktion der schnellen Steroidwirkungen, die klassischen Wirkungen zu potenzieren. Demnach wären diese nicht-genomischen Wirkungen ein integraler Bestandteil der genomischen Wirkungen, die an physiologischen wie pathophysiologischen Prozessen beteiligt sein könnten.[109]

Sollten die mGCR zentrale Wirkungen auf die GC-vermittelte Zelllyse haben, wäre dies von großer klinischer Bedeutung. Unter Umständen könnte damit auch erklärt werden, warum einige

Patienten nicht auf die Behandlung von z.B. Lymphomen ansprechen (non-responder) bzw. diese Ansprechbarkeit im Laufe der Therapie nachlässt. Aber auch für andere Effekte der GC könnten die mGCR mit verantwortlich sein im Sinne der eingangs erwähnten nicht-genomischen Wirkmechanismen.[15] Die Auswahl des richtigen Glucocorticoids ist nach Lipworth wichtig für die richtige Mischung aus genomischer und nicht-genomischer Aktivität.[124] Hier können die unterschiedlichen relativen Wirkpotenzen für genomische und nicht-genomische Wirkmechanismen[48, 51] relevant werden. Die weitere Erforschung der nicht-genomischen Glucocorticoidwirkungen wird daher in naher Zukunft von großer Bedeutung sein, nicht zuletzt im Hinblick auf die Entwicklung einer spezifischen pharmakologischen Therapie.

4.2.2 Zusammenfassung

Wir untersuchten in diesem zweiten Teil der Arbeit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes auf die Expression von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren. Die Umstände für die Expression dieser Rezeptoren, ihre Struktur sowie ihre Funktion sind noch weitgehend unbekannt. Zur Detektion der vermutlich nur in geringer Zahl exprimierten Rezeptoren verwendeten wir die Durchflusszytometrie unter Zuhilfenahme einer hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung mit magnetofluoreszenten Liposomen. Erstmalig wurde eine systematische Untersuchung gesunder Spender durchgeführt. Ebenfalls erstmalig waren die Untersuchungen von Impfprobanden sowie Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Membranständige Glucocorticoidrezeptoren existieren physiologischerweise auf B-Lymphozyten und Monozyten. Auf T-Lymphozyten und Granulozyten konnten sie nicht nachgewiesen werden. Ihre Expression wird offensichtlich stimuliert durch Infekte, Impfungen und entzündlich-rheumatische Erkrankungen. Letzteres zeigten wir für die rheumatoide Arthritis. Bei Monozyten zeigte sich darüber hinaus eine starke Korrelation zwischen der Aktivität der rheumatoiden Arthritis und dem Anteil mGCR-positiver Zellen. Auch bei einer Patientin mit einem Schub eines Lupus erythematoses waren die Werte für mGCR-positive Monozyten stark erhöht. Man könnte daher vermuten, dass das Ausmaß der Expression mit der immunologischen Aktivität des Körpers zusammen hänge. Die Färbetechnik erlaubt es nicht, eindeutig zwischen mGCR-negativen Zellen und mGCR-positiven unterhalb des Detektionsminimums zu unterscheiden. Es kann also einerseits sein, dass eine Zellsubpopulation mGCR exprimieren und diese Subpopulation bei Stimulation anwächst. Dadurch erhöht sich auch der Anteil mGCR-positiver Zellen. Andererseits ist vorstellbar, dass alle Zellen in geringer Zahl mGCR exprimieren. Ein Teil dieser Zellen, der sich bei Stimulation erhöht, erreicht das Detektionslimit bzw. übertrifft es. Aufgrund der gemessenen Kinetik der

mGCR-Expression auf CCRF-CEM-Zellen favorisieren wir die zweite Hypothese. Dies würde bedeuten, dass auch T-Lymphozyten mGCR in sehr geringer Zahl exprimieren könnten. Möglicherweise würden diese Zellen dann auf andere Stimuli mit der Expression von mGCR reagieren.

Bezüglich der Funktion der mGCR gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose. Außerdem könnte die Expression der Rezeptoren mit der Pathogenese von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, im speziellen der RA, zusammenhängen. Darüber hinaus potenzieren die nicht-genomischen Wirkmechanismen über mGCR möglicherweise die genomischen Wirkungen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Glucocorticoidforschung zu gewinnen. In zwei Teilen wurden folgende Problemstellungen untersucht:

1. In einer klinischen Studie wurde der Frage nachgegangen, welche Wirkungen und Nebenwirkungen durch eine niedrig bis mittel dosierte Langzeittherapie mit Methylprednisolon bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen bedingt sind. Außerdem wurde die gesundheitsbezogene Lebensqualität mittels eines standardisierten Fragebogens (Short-Form 36) untersucht.
2. In durchflusszytometrischen Experimenten wurde systematisch die Expression von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren (mGCR) auf humanen Blutzellen erforscht. Die Zielstellung war dabei, einen Beitrag zu der Entschlüsselung nicht-genomischer Wirkmechanismen der Glucocorticoide zu leisten.

In der klinischen Studie wurden zwei Patientengruppen miteinander verglichen, die unterschiedlich hohe mittlere Dosen von Methylprednisolon bekamen. Die Dosisgruppe 1 erhielt eine low-dose Therapie mit durchschnittlich 4,11 mg MP/die, die Dosisgruppe 2 eine medium-dose Therapie mit im Mittel 9,04 mg MP/die. Die Therapiedauer betrug mindestens ein Jahr.

Die Knochendichte war bei über 2/3 aller Patienten vermindert. Die Tendenz der Regressionsgerade in der graphischen Darstellung lässt vermuten, dass eine höhere tägliche Dosis von MP zu einer verstärkten Abnahme der Knochendichte führt. Unsere Daten zeigten jedoch keinen Zusammenhang *höhere Dosis* → *geringere Knochendichte* mit statistischer Signifikanz. Vielmehr fanden wir, dass schon sehr niedrige Dosen von Methylprednisolon, über längere Zeit verabreicht, die Knochendichte deutlich reduzieren können.

Ebenfalls beeinflussten bereits geringe Dosen von Methylprednisolon den Knochenstoffwechsel, was sich in den erhöhten Werten der Knochenumsatzparameter (v.a. der Knochenabbauparameter) zeigte. Nachfolgende Untersuchungen mit einer größeren Patientenzahl werden möglicherweise deutlichere Unterschiede zwischen den Dosisgruppen bei der Knochendichte und den Knochenumsatzparametern zeigen, da hierbei die individuellen Variablen für die Entwicklung einer Osteoporose an Relevanz verlieren.

Insgesamt 35 von 42 Patienten (83,3 %) wiesen eine verminderte Knochendichte, erhöhte Knochenabbauparameter oder beides auf. Diese zwei Kriterien sind wichtige Risikofaktoren für zukünftige Frakturen.

Ein erhöhter Augeninnendruck sowie osteoporosetypische Rückenschmerzen traten häufiger bei

der medium-dose Therapie als bei der low-dose Therapie auf. Es zeigten sich hier deutliche Tendenzen, die statistische Signifikanz wurde jedoch meist nicht erreicht (Ausnahme: Einschätzung der osteoporosetypischen Schmerzen mittels VAS). Auch hier müssen nachfolgende Studien mit größeren Patientenzahlen überprüfen, ob im low-dose Bereich tatsächlich ein geringeres Risiko für die Entstehung dieser unerwünschten Wirkungen besteht als im medium-dose Bereich. In diesem Fall wäre eine straff niedrige Dosiseinstellung anzustreben.

Unabhängig von der Dosierung waren bei den untersuchten Patienten folgende unerwünschten Wirkungen häufig zu beobachten: Pergamenthaut (73,8 %), Unterblutungen der Haut (76,2 %) sowie eine Cushing-Symptomatik (61,9 % nach Einschätzung des Arztes). Diese Nebenwirkungen lassen sich auch durch eine sehr niedrig dosierte Glucocorticoidtherapie nur schwer vermeiden.

Die Aktivität der Grunderkrankung war in den meisten Fällen unter der niedrig-dosierten GC-Therapie sowie ggf. der Zusatzmedikation (Basistherapeutika, NSAR) gut kontrolliert. Vereinzelt traten jedoch erhöhte Entzündungsparameter auf. Dies verdeutlicht, dass sich die niedrig dosierte GC-Therapie im Grenzbereich zwischen Kontrolle der Krankheitsaktivität mit möglichst geringer Dosis auf der einen Seite und Reaktivierung der Grunderkrankung auf der anderen Seite bewegt. Regelmäßige Kontrolle und evtl. Anpassung der Therapie sind daher erforderlich.

Die gesundheitsbezogene Lebensqualität unterschied sich zwischen den Dosisgruppen nicht signifikant. Innerhalb des Bereichs der low-dose und der medium-dose Glucocorticoidtherapie ist die Dosishöhe also offensichtlich kein ausschlaggebender Faktor für die Lebensqualität. Allgemein war im Verhältnis zu einer Normpopulation die physische Lebensqualität deutlich stärker eingeschränkt als die psychosoziale. Letztere bewegte sich nur geringgradig unterhalb der Normwerte.

In den durchflusszytometrischen Experimenten verwendeten wir eine hochsensitive Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren. Es wird vermutet, dass u.a. diese Rezeptoren die nicht-genomischen Wirkungen der Glucocorticoide vermitteln. Wir gehen davon aus, dass die mGCR nur in geringer Anzahl an der Zelloberfläche exprimiert werden, weshalb sie mit konventionellen Färbemethoden lediglich auf mGCR-angereicherten Zellen nachgewiesen werden konnten. Die von uns verwendete Färbung mit magnetofluoreszenten Liposomen erlaubt den positiven Nachweis bereits ab wenigen hundert Molekülen pro Zelle. Erstmals wurden systematisch weiße Blutzellen von gesunden Spendern auf die Expression von mGCR untersucht. Unsere Untersuchungen ergaben, dass mGCR auf Monozyten und B-Lymphozyten physiologischerweise exprimiert werden. Bis zu 7,2 % der Monozyten (im Mittel

4,67 %) und bis zu 5 % der B-Lymphozyten (im Mittel 2,79 %) waren positiv für mGCR bei gesunden Probanden. Auf T-Lymphozyten und Granulozyten ließen sich keine mGCR nachweisen.

Darüber hinaus wurden erstmals PBMC von Impfprobanden und Patienten mit rheumatoider Arthritis auf die Expression von mGCR untersucht. Bei den Probanden nach einer Booster-Impfung gegen Hepatitis B zeigte sich in der longitudinalen Untersuchung, dass ca. eine Woche nach der Impfung der Anteil mGCR-positiver Monozyten und B-Lymphozyten auf das 3- bis 4-fache der Ausgangswerte angestiegen war. Die Werte näherten sich nach einigen Wochen wieder diesen Ausgangswerten an. Die Impfungen schienen in diesen Experimenten ein Stimulus für die verstärkte Expression von mGCR zu sein.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung des Immunsystems zu einer erhöhten Expression der mGCR führt. Die Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis sollte zeigen, ob sich die Expression von mGCR auf PBMC mit der Krankheitsaktivität verändert. Es fanden sich allgemein erhöhte Werte für die Anteile mGCR-positiver Monozyten (im Mittel 10,13 %) und B-Lymphozyten (im Mittel 4,15 %). Zudem zeigte sich eine starke Korrelation der Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis mit dem Anteil mGCR-positiver Monozyten. Auch bei einer Patientin mit hoher Aktivität eines Lupus erythematoses wurden sehr hohe Werte für den Anteil mGCR-positiver Monozyten gemessen.

Wir schlussfolgern daher, dass:

1. mGCR physiologischerweise auf Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert werden. Auf T-Lymphozyten sind sie nicht nachweisbar.
2. die Anzahl der exprimierten mGCR zu gering ist, um mit konventionellen Färbemethoden detektiert zu werden.
3. die Expression von mGCR auf B-Lymphozyten und vor allem Monozyten offensichtlich durch Immunstimuli hochreguliert wird. Für die RA besteht ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Grad der Krankheitsaktivität und dem Anteil mGCR-positiver Monozyten.

Die mGCR könnten eine Rolle bei der Induktion von Apoptose spielen im Sinne eines negativen Feed-back-Mechanismus bei überschießender Immunantwort. Auch eine Rolle bei der Pathogenese von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen ist denkbar.

Literaturverzeichnis

- [1] Kirwan, J. R. (1995): The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group, N Engl J Med (vol. 333), No. 3, pp. 142-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7791815
- [2] Weusten, B. L.; Jacobs, J. W. and Bijlsma, J. W. (1993): Corticosteroid pulse therapy in active rheumatoid arthritis, Semin Arthritis Rheum (vol. 23), No. 3, pp. 183-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8122121
- [3] Youssef, P. P.; Cormack, J.; Evill, C. A.; Peter, D. T.; Roberts-Thomson, P. J.; Ahern, M. J. and Smith, M. D. (1996): Neutrophil trafficking into inflamed joints in patients with rheumatoid arthritis, and the effects of methylprednisolone, Arthritis Rheum (vol. 39), No. 2, pp. 216-25. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8849371
- [4] Youssef, P. P.; Haynes, D. R.; Triantafillou, S.; Parker, A.; Gamble, J. R.; Roberts-Thomson, P. J.; Ahern, M. J. and Smith, M. D. (1997): Effects of pulse methylprednisolone on inflammatory mediators in peripheral blood, synovial fluid, and synovial membrane in rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum (vol. 40), No. 8, pp. 1400-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9259419
- [5] Hall, E. D. (1992): The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone, J Neurosurg (vol. 76), No. 1, pp. 13-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1727150
- [6] Bracken, M. B.; Shepard, M. J.; Collins, W. F., Jr.; Holford, T. R.; Baskin, D. S.; Eisenberg, H. M.; Flamm, E.; Leo-Summers, L.; Maroon, J. C.; Marshall, L. F. and et al. (1992): Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study, J Neurosurg (vol. 76), No. 1, pp. 23-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1727165
- [7] Hatz, Hans J. (1998), Glucocorticoide - Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien pp. 169-264, 552-554, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart.
- [8] Hatz, H. J. and Helmke, K. (1992): Polymyalgia rheumatica und Riesenzellarteriitis; Diag-

- nostik und Nebenwirkungsprofil bei niedrig-dosierter Glukokortikoidlangzeittherapie, *Z Rheumatol* (vol. 51), No. 5, pp. 213-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1476006
- [9] Helmke, K, Glombik Th, Kuckein D, Stein A (1998): Steroid-Osteopenie und Osteoporose unter Methylprednisolon-oder Fluocortolon-Therapie, *Aktuelle Rheumatologie* (vol. 23), pp. 109-14.
- [10] Caldwell, J. R. and Furst, D. E. (1991): The efficacy and safety of low-dose corticosteroids for rheumatoid arthritis, *Semin Arthritis Rheum* (vol. 21), No. 1, pp. 1-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1948096
- [11] Saag, K. G.; Koehnke, R.; Caldwell, J. R.; Brasington, R.; Burmeister, L. F.; Zimmerman, B.; Kohler, J. A. and Furst, D. E. (1994): Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events, *Am J Med* (vol. 96), No. 2, pp. 115-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8109596
- [12] van Staa, T. P.; Leufkens, H. G.; Abenhaim, L.; Zhang, B. and Cooper, C. (2000): Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses, *Rheumatology (Oxford)* (vol. 39), No. 12, pp. 1383-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11136882
- [13] Van Staa, T. P.; Leufkens, H. G.; Abenhaim, L.; Zhang, B. and Cooper, C. (2000): Use of oral corticosteroids and risk of fractures, *J Bone Miner Res* (vol. 15), No. 6, pp. 993-1000. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10841167
- [14] de Nijs, R. N.; Jacobs, J. W.; Bijlsma, J. W.; Lems, W. F.; Laan, R. F.; Houben, H. H.; ter Borg, E. J.; Huisman, A. M.; Bruyn, G. A.; van Oijen, P. L.; Westgeest, A. A.; Algra, A. and Hofman, D. M. (2001): Prevalence of vertebral deformities and symptomatic vertebral fractures in corticosteroid treated patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)* (vol. 40), No. 12, pp. 1375-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11752508
- [15] Buttgereit, Frank, Wehling M, Burmester GR (1998): A new hypothesis of modular glucocorticoid actions., *Arthritis Rheumatism* (vol. 41), No. 5, pp. 761-7.
- [16] Tyrrell, JB. (1995): Glucocorticoid therapy, Felig, P, Baxter JD, Frohman LA, *Endocrinology and metabolism*, 3. ed., pp. 855-82, McGraw-Hill, Inc., New York.

- [17] Groner, B, Hynes NE, Rahmsdorf U, Ponta H (1983): Transcription initiation of transfected mouse mammary tumor virus LTR DNA is regulated by glucocorticoid hormones., *Nucleic Acids Res* (vol. 11), No. 14, pp. 4713-25.
- [18] Buttgereit, F. and Scheffold, A. (2002): Rapid glucocorticoid effects on immune cells, *Steroids* (vol. 67), No. 6, pp. 529-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11960631
- [19] Croxtall, J D, Choudhury Q, Flower RJ (2000): Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism, *Br J Pharmacol* (vol. 130), pp. 289-98.
- [20] Schmidt, B M, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. (2000): Rapid, nongenomic steroid actions: A new age?, *Front Neuroendocrinol* (vol. 21), No. 1, pp. 57-94.
- [21] Selye, H (1942): Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids, *Endocrinology* (vol. 30), pp. 437-53.
- [22] Edwardson, J A, Bennett GW (1974): Modulation of corticotrophin-releasing factor release from hypothalamic synaptosomes, *Nature* (vol. 251), No. 5474, pp. 425-7.
- [23] Sutter-Dub, M. T. (2002): Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types, *Steroids* (vol. 67), No. 2, pp. 77-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11755172
- [24] Boumpas, D T, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993): Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates, *Ann Intern Med* (vol. 119), No. 12, pp. 1198-208.
- [25] Bamberger, C M, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP (1995): Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans, *J Clin Invest* (vol. 95), No. 6, pp. 2435-41.
- [26] Adcock, I M (2000): Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 13), No. 3, pp. 115-26.
- [27] Barnes, P J, Karin M (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *N Engl J Med* (vol. 336), No. 15, pp. 1066-71.
- [28] Haddad, E B, Salmon M, Koto H, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF (1996): Ozone induc-

- tion of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids, *FEBS Lett* (vol. 379), No. 3, pp. 265-8.
- [29] Boumpas, D T (1996): A novel action of glucocorticoids - NF-kappa B inhibition, *Br J Rheumatol* (vol. 35), No. 8, pp. 709-10.
 - [30] Christ, M.; Meyer, C.; Sippel, K. and Wehling, M. (1995): Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 213), No. 1, pp. 123-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7639725
 - [31] Wehling, M. (1995): Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action, *Steroids* (vol. 60), No. 1, pp. 153-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7792803
 - [32] Wehling, M. (1996): Non-genomic steroid action--take a closer look, it's not rare! An invited commentary, *Eur J Endocrinol* (vol. 135), No. 3, pp. 287-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8890717
 - [33] Benten, W. P.; Lieberherr, M.; Giese, G.; Wrehlke, C.; Stamm, O.; Sekeris, C. E.; Mossmann, H. and Wunderlich, F. (1999): Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells, *Faseb J* (vol. 13), No. 1, pp. 123-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9872937
 - [34] Benten, W. P.; Stephan, C. and Wunderlich, F. (2002): B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol, *Steroids* (vol. 67), No. 7, pp. 647-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11996938
 - [35] Benten, W. P.; Lieberherr, M.; Sekeris, C. E. and Wunderlich, F. (1997): Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells, *FEBS Lett* (vol. 407), No. 2, pp. 211-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9166901
 - [36] Benten, W. P.; Stephan, C.; Lieberherr, M. and Wunderlich, F. (2001): Estradiol signaling via sequesterable surface receptors, *Endocrinology* (vol. 142), No. 4, pp. 1669-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11250949
 - [37] Norfleet, A. M.; Thomas, M. L.; Gametchu, B. and Watson, C. S. (1999): Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary

- tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry, *Endocrinology* (vol. 140), No. 8, pp. 3805-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10433242
- [38] Norfleet, A. M.; Clarke, C. H.; Gametchu, B. and Watson, C. S. (2000): Antibodies to the estrogen receptor-alpha modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors, *FASEB J* (vol. 14), No. 1, pp. 157-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10627290
 - [39] Orchinik, M, Murray TF, Moore FL (1991): A corticosteroid receptor in neuronal membranes, *Science* (vol. 252), No. 5014, pp. 1848-51.
 - [40] Orchinik, M, Murray TF, Franklin PH, Moore FL (1992): Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 89), No. 9, pp. 3830-4.
 - [41] Chen, F, Watson CS, Gametchu B (1999): Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells, *J Cell Biochem* (vol. 74), No. 3, pp. 430-46.
 - [42] Chen, F, Watson CS, Gametchu B (1999): Multiple glucocorticoid receptor transcripts in membrane glucocorticoid receptor-enriched S-49 mouse lymphoma cells, *J Cell Biochem* (vol. 74), No. 3, pp. 418-29.
 - [43] Gametchu, B, Watson CS, Wu S (1993): Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients, *FASEB J* (vol. 7), No. 13, pp. 1283-92.
 - [44] Gametchu, B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS (1999): Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models, *Steroids* (vol. 64), No. 1-2, pp. 107-19.
 - [45] Bienert, Maren (2001): Untersuchungen zu Mechanismen nichtgenomischer Glucocorticoidwirkungen, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
 - [46] Evans, S J, Murray TF, Moore FL (2000): Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain, *J Steroid Biochem Mol Biol* (vol. 72), No. 5, pp. 209-21.
 - [47] Nadal, A.; Roperio, A. B.; Fuentes, E. and Soria, B. (2001): The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear?, *Trends Pharmacol Sci* (vol. 22), No. 12, pp. 597-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11711111

[n&list_uids=11730951](#)

- [48] Schmid, D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgereit F (2000): Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states, *Biosci Rep* (vol. 20), No. 4, pp. 289-302.
- [49] Buttgereit, F, Brand MD, Muller M (1993): Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and ConA-stimulated thymocytes of the rat, *Biosci Rep* (vol. 13), No. 1, pp. 41-52.
- [50] Buttgereit, F.; Krauss, S. and Brand, M. D. (1997): Methylprednisolone inhibits uptake of Ca²⁺ and Na⁺ ions into concanavalin A-stimulated thymocytes, *Biochem J* (vol. 326 (Pt 2)), pp. 329-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9291100
- [51] Buttgereit, F.; Burmester, G. R. and Brand, M. D. (2000): Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects, *Immunol Today* (vol. 21), No. 4, pp. 192-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10740243
- [52] Buttgereit, F.; Brand, M. D. and Burmester, G. R. (1999): Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy, *Biochem Pharmacol* (vol. 58), No. 2, pp. 363-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10423179
- [53] Hafezi-Moghadam, A.; Simoncini, T.; Yang, E.; Limbourg, F. P.; Plumier, J. C.; Rebsamen, M. C.; Hsieh, C. M.; Chui, D. S.; Thomas, K. L.; Prorock, A. J.; Laubach, V. E.; Moskowitz, M. A.; French, B. A.; Ley, K. and Liao, J. K. (2002): Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase, *Nat Med* (vol. 8), No. 5, pp. 473-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11984591
- [54] Reid, I. R. (2000): Glucocorticoid-induced osteoporosis, *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (vol. 14), No. 2, pp. 279-98. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11035907
- [55] Ringe, J. D. (1990): Pathogenese der Kortikoidosteoporose, *Fortschr Med* (vol. 108), No. 20, pp. 393-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2202618

- [56] Magaro, M.; Tricerri, A.; Piane, D.; Zoli, A.; Serra, F.; Altomonte, L. and Mirone, L. (1991): Generalized osteoporosis in non-steroid treated rheumatoid arthritis, *Rheumatol Int* (vol. 11), No. 2, pp. 73-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1947672
- [57] Gough, A. K.; Lilley, J.; Eyre, S.; Holder, R. L. and Emery, P. (1994): Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis, *Lancet* (vol. 344), No. 8914, pp. 23-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7912297
- [58] LoCascio, V.; Bonucci, E.; Imbimbo, B.; Ballanti, P.; Adami, S.; Milani, S.; Tartarotti, D. and DellaRocca, C. (1990): Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy, *Bone Miner* (vol. 8), No. 1, pp. 39-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2306553
- [59] Rubin, M. R. and Bilezikian, J. P. (2002): Clinical review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence, *J Clin Endocrinol Metab* (vol. 87), No. 9, pp. 4033-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12213840
- [60] Patschan, D.; Loddenkemper, K. and Buttgereit, F. (2001): Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis, *Bone* (vol. 29), No. 6, pp. 498-505. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11728918
- [61] Buttgereit, F.; da Silva, J. A.; Boers, M.; Burmester, G. R.; Cutolo, M.; Jacobs, J.; Kirwan, J.; Kohler, L.; Van Riel, P.; Vischer, T. and Bijlsma, J. W. (2002): Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology, *Ann Rheum Dis* (vol. 61), No. 8, pp. 718-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12117678
- [62] Kanis, J. A.; Black, D.; Cooper, C.; Dargent, P.; Dawson-Hughes, B.; De Laet, C.; Delmas, P.; Eisman, J.; Johnell, O.; Jonsson, B.; Melton, L.; Oden, A.; Papapoulos, S.; Pols, H.; Rizzoli, R.; Silman, A. and Tenenhouse, A. (2002): A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis, *Osteoporos Int* (vol. 13), No. 7, pp. 527-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12111012
- [63] Kanis, J. A. (1997): Diagnosis of osteoporosis, *Osteoporos Int* (vol. 7 Suppl 3), pp. S108-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9536315

- [64] Marshall, D.; Johnell, O. and Wedel, H. (1996): Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures, *Bmj* (vol. 312), No. 7041, pp. 1254-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8634613
- [65] (1993): Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April 1-2, 1993, *Am J Med* (vol. 95), No. 5A, pp. 1S-78S. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8256786
- [66] (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group, *World Health Organ Tech Rep Ser* (vol. 843), pp. 1-129. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7941614
- [67] Kanis, J. A.; Johnell, O.; Oden, A.; Sembo, I.; Redlund-Johnell, I.; Dawson, A.; De Laet, C. and Jonsson, B. (2000): Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo, *Osteoporos Int* (vol. 11), No. 8, pp. 669-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11095169
- [68] Kanis, J. A. and Gluer, C. C. (2000): An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation, *Osteoporos Int* (vol. 11), No. 3, pp. 192-202. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10824234
- [69] Johnell, O.; Oden, A.; De Laet, C.; Garnero, P.; Delmas, P. D. and Kanis, J. A. (2002): Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability, *Osteoporos Int* (vol. 13), No. 7, pp. 523-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12111011
- [70] Seibel, M J Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Anwendung in der Osteoporose-Diagnostik, Dambacher, M A; Ringe, J D and Schacht, E, *Programmed - Moderne Osteoporosetherapie* Jhrg. 20 Suppl. 1 pp. 19-24, Programmed Verlag, Frankfurt.
- [71] Miller, P. D.; Baran, D. T.; Bilezikian, J. P.; Greenspan, S. L.; Lindsay, R.; Riggs, B. L. and Watts, N. B. (1999): Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover: Consensus of an expert panel, *J Clin Densitom* (vol. 2), No. 3, pp. 323-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10548827
- [72] Kanis, J. A.; Johnell, O.; Oden, A.; Dawson, A.; De Laet, C. and Jonsson, B. (2001): Ten

- year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds, *Osteoporos Int* (vol. 12), No. 12, pp. 989-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846333
- [73] Garnero, P. and Delmas, P. D. (1998): Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis, *Endocrinol Metab Clin North Am* (vol. 27), No. 2, pp. 303-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9669140
- [74] Bauer, D. C.; Sklarin, P. M.; Stone, K. L.; Black, D. M.; Nevitt, M. C.; Ensrud, K. E.; Arnaud, C. D.; Genant, H. K.; Garnero, P.; Delmas, P. D.; Lawaetz, H. and Cummings, S. R. (1999): Biochemical markers of bone turnover and prediction of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures, *J Bone Miner Res* (vol. 14), No. 8, pp. 1404-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10457273
- [75] Ross, P. D. and Knowlton, W. (1998): Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers, *J Bone Miner Res* (vol. 13), No. 2, pp. 297-302. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9495524
- [76] Looker, A. C.; Bauer, D. C.; Chesnut, C. H., 3rd; Gundberg, C. M.; Hochberg, M. C.; Klee, G.; Kleerekoper, M.; Watts, N. B. and Bell, N. H. (2000): Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions, *Osteoporos Int* (vol. 11), No. 6, pp. 467-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10982161
- [77] Garnero, P.; Hausherr, E.; Chapuy, M. C.; Marcelli, C.; Grandjean, H.; Muller, C.; Cormier, C.; Breart, G.; Meunier, P. J. and Delmas, P. D. (1996): Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study, *J Bone Miner Res* (vol. 11), No. 10, pp. 1531-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8889854
- [78] Melton, L. J., 3rd; Khosla, S.; Atkinson, E. J.; O'Fallon, W. M. and Riggs, B. L. (1997): Relationship of bone turnover to bone density and fractures, *J Bone Miner Res* (vol. 12), No. 7, pp. 1083-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9200008
- [79] Riggs, B. L. (2000): Are biochemical markers for bone turnover clinically useful for monitoring therapy in individual osteoporotic patients?, *Bone* (vol. 26), No. 6, pp. 551-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10831924

- [80] Riggs, B. L.; Melton, L. J., 3rd and O'Fallon, W. M. (1996): Drug therapy for vertebral fractures in osteoporosis: evidence that decreases in bone turnover and increases in bone mass both determine antifracture efficacy, *Bone* (vol. 18), No. 3 Suppl, pp. 197S-201S. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8777088
- [81] Berki, T.; Kumanovics, G.; Kumanovics, A.; Falus, A.; Ujhelyi, E. and Nemeth, P. (1998): Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody, *J Immunol Methods* (vol. 214), No. 1-2, pp. 19-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9692855
- [82] Scheffold, A. and Radbruch, A. (1998): Phenotyping and separation of leucocyte populations based on affinity labelling, *Methods in Microbiology* (vol. 25) pp. 23-56, Academic-Press-Ltd.
- [83] Scheffold, A.; Assenmacher, M.; Reiners-Schramm, L.; Lauster, R. and Radbruch, A. (2000): High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells, *Nat Med* (vol. 6), No. 1, pp. 107-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10613835
- [84] Shapiro, H (1988), in: *Practical Flow Cytometry*, Alan R. Liss, New York.
- [85] Scheffold, A.; Miltenyi, S. and Radbruch, A. (1995): Magnetofluorescent liposomes for increased sensitivity of immunofluorescence, *Immunotechnology* (vol. 1), No. 2, pp. 127-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9373341
- [86] Salaffi, F.; Peroni, M. and Ferraccioli, G. F. (2000): Discriminating ability of composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis: a comparison of the Chronic Arthritis Systemic Index, Disease Activity Score and Thompson's articular index, *Rheumatology* (Oxford) (vol. 39), No. 1, pp. 90-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10662880
- [87] Bullinger, Monika and Kirchberger, Inge (1998): *SF-36 Fragebogen zum Gesundheitszustand - Handanweisungen*, Hogrefe-Verlag, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle.
- [88] Harris, E. D., Jr.; Emkey, R. D.; Nichols, J. E. and Newberg, A. (1983): Low dose prednisone therapy in rheumatoid arthritis: a double blind study, *J Rheumatol* (vol. 10), No. 5, pp. 713-21. URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>

[n&list_uids=6358491](#)

- [89] Verhoeven, A. C.; Boers, M.; te Koppele, J. M.; van der Laan, W. H.; Markusse, H. M.; Geusens, P. and van der Linden, S. (2001): Bone turnover, joint damage and bone mineral density in early rheumatoid arthritis treated with combination therapy including high-dose prednisolone, *Rheumatology (Oxford)* (vol. 40), No. 11, pp. 1231-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11709606
- [90] Espallargues, M.; Sampietro-Colom, L.; Estrada, M. D.; Sola, M.; del Rio, L.; Setoain, J. and Granados, A. (2001): Identifying bone-mass-related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature, *Osteoporos Int* (vol. 12), No. 10, pp. 811-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11716183
- [91] Reid, I. R. (2001): Time to end steroid-induced fractures, *Arch Dermatol* (vol. 137), No. 4, pp. 493-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11295932
- [92] van Staa, T. P.; Abenhaim, L.; Cooper, C.; Zhang, B. and Leufkens, H. G. (2001): Public health impact of adverse bone effects of oral corticosteroids, *Br J Clin Pharmacol* (vol. 51), No. 6, pp. 601-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11422020
- [93] Melton, L. J., 3rd (1995): How many women have osteoporosis now?, *J Bone Miner Res* (vol. 10), No. 2, pp. 175-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7754796
- [94] Tripathi, R. C.; Parapuram, S. K.; Tripathi, B. J.; Zhong, Y. and Chalam, K. V. (1999): Corticosteroids and glaucoma risk, *Drugs Aging* (vol. 15), No. 6, pp. 439-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10641955
- [95] Bijlsma, J. W.; Van Everdingen, A. A.; Huisman, M.; De Nijs, R. N. and Jacobs, J. W. (2002): Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: effects on erosions and bone, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 966), pp. 82-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12114262
- [96] Cohen, M. D. and Conn, D. L. (1997): Benefits of low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis, *Bull Rheum Dis* (vol. 46), No. 4, pp. 4-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9254796

[n&list_uids=9188203](#)

- [97] Kirwan, J. R. (2001): Systemic low-dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis, *Rheum Dis Clin North Am* (vol. 27), No. 2, pp. 389-403, ix-x. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11396099
- [98] van Everdingen, A. A.; Jacobs, J. W.; Siewerts Van Reesema, D. R. and Bijlsma, J. W. (2002): Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Ann Intern Med* (vol. 136), No. 1, pp. 1-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11777359
- [99] (1946): Preamble to the Constitution of the World Health Organization, International Health Conference.
- [100] Stavem, K.; Lossius, M. I.; Kvien, T. K. and Guldvog, B. (2000): The health-related quality of life of patients with epilepsy compared with angina pectoris, rheumatoid arthritis, asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Qual Life Res* (vol. 9), No. 7, pp. 865-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11297029
- [101] Evans, S. J.; Moore, F. L. and Murray, T. F. (1998): Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain, *J Steroid Biochem Mol Biol* (vol. 67), No. 1, pp. 1-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9780023
- [102] Grote, H.; Ioannou, I.; Voigt, J. and Sekeris, C. E. (1993): Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: evidence for plasma membrane bound receptor, *Int J Biochem* (vol. 25), No. 11, pp. 1593-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8288028
- [103] Christ, M.; Eisen, C.; Aktas, J.; Theisen, K. and Wehling, M. (1993): The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes, *J Clin Endocrinol Metab* (vol. 77), No. 6, pp. 1452-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8263127
- [104] Wehling, M.; Neylon, C. B.; Fullerton, M.; Bobik, A. and Funder, J. W. (1995): Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells, *Circ Res* (vol. 76), No. 6, pp. 973-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8544444

[n&list_uids=7758168](#)

- [105] Christ, M.; Gunther, A.; Heck, M.; Schmidt, B. M.; Falkenstein, E. and Wehling, M. (1999): Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells, *Circulation* (vol. 99), No. 11, pp. 1485-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10086974
- [106] Borski, R. J. (2000): Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates, *Trends Endocrinol Metab* (vol. 11), No. 10, pp. 427-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11091121
- [107] Borski, R. J.; Hyde, G. N. and Fruchtmann, S. (2002): Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release, *Steroids* (vol. 67), No. 6, pp. 539-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11960633
- [108] Solito, E.; Mulla, A.; Morris, J. F.; Christian, H. C.; Flower, R. J. and Buckingham, J. C. (2003): Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase, *Endocrinology* (vol. 144), No. 4, pp. 1164-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12639897
- [109] Cato, A. C.; Nestl, A. and Mink, S. (2002): Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways, *Sci STKE* (vol. 2002), No. 138, p. RE9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12084906
- [110] Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G. L. and Levin, E. R. (1999): Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells, *Mol Endocrinol* (vol. 13), No. 2, pp. 307-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973260
- [111] Tanaka, H.; Akama, H.; Ichikawa, Y.; Homma, M. and Oshima, H. (1991): Glucocorticoid receptors in normal leukocytes: effects of age, gender, season, and plasma cortisol concentrations, *Clin Chem* (vol. 37), No. 10 Pt 1, pp. 1715-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1914170
- [112] Gametchu, B. (1987): Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes:

- correlation to cell lysis, *Science* (vol. 236), No. 4800, pp. 456-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3563523
- [113] Andreae, J.; Tripmacher, R.; Weltrich, R.; Rohde, W.; Keitzer, R.; Wahn, U.; Paul, K. and Buttgerit, F. (2001): Effect of glucocorticoid therapy on glucocorticoid receptors in children with autoimmune diseases, *Pediatr Res* (vol. 49), No. 1, pp. 130-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11134503
- [114] Zola, H.; Flego, L. and Sheldon, A. (1992): Detection of cytokine receptors by high-sensitivity immunofluorescence/flow cytometry, *Immunobiology* (vol. 185), No. 2-4, pp. 350-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1452210
- [115] Bruno, L.; Scheffold, A.; Radbruch, A. and Owen, M. J. (1999): Threshold of pre-T-cell-receptor surface expression is associated with alphabeta T-cell lineage commitment, *Curr Biol* (vol. 9), No. 11, pp. 559-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359697
- [116] Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; Healey, L. A.; Kaplan, S. R.; Liang, M. H.; Luthra, H. S. and et al. (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (vol. 31), No. 3, pp. 315-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3358796
- [117] Russell, K. S.; Haynes, M. P.; Sinha, D.; Clerisme, E. and Bender, J. R. (2000): Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 11, pp. 5930-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10823945
- [118] Dowd, D. R.; Ryerse, J. S.; MacDonald, P. N.; Miesfeld, R. L. and Kamradt, M. C. (1997): Crosstalk during Ca^{2+} -, cAMP-, and glucocorticoid-induced gene expression in lymphocytes, *Mol Cell Endocrinol* (vol. 128), No. 1-2, pp. 29-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9140073
- [119] Asada, A.; Zhao, Y.; Kondo, S. and Iwata, M. (1998): Induction of thymocyte apoptosis by Ca^{2+} -independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 43, pp. 28392-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9774466

- [120] Kofler, R. (2000): The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells, *Histochem Cell Biol* (vol. 114), No. 1, pp. 1-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10959816
- [121] Thompson, E. B. (1999): Mechanisms of T-cell Apoptosis Induced by Glucocorticoids, *Trends Endocrinol Metab* (vol. 10), No. 9, pp. 353-358. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10511694
- [122] Gold, R.; Buttgereit, F. and Toyka, K. V. (2001): Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders, *J Neuroimmunol* (vol. 117), No. 1-2, pp. 1-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11430999
- [123] Kousteni, S.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Bodenner, D. L.; Han, L.; Han, K.; DiGregorio, G. B.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Roberson, P. K.; Weinstein, R. S.; Jilka, R. L. and Manolagas, S. C. (2001): Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity, *Cell* (vol. 104), No. 5, pp. 719-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11257226
- [124] Lipworth, B. J. (2000): Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity, *Lancet* (vol. 356), No. 9224, pp. 87-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10963239

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Buttgereit für den Vorschlag des Themas und die hervorragende Betreuung. Er war für mich jederzeit ansprechbar und erledigte selbst umfangreiche Korrekturarbeiten prompt. Mit seinen Doktoranden pflegt er einen kollegialen und fairen Umgang. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Alexander Scheffold für die kompetente und freundliche Anleitung bei der Zytometrie. Ihm sowie seiner reizenden Arbeitsgruppe im Deutschen Rheumaforschungszentrum, bestehend aus Désirée Kunkel, Till Muzzolini, Maurus de la Rosa und Frank Hardung, verdanke ich eine sehr angenehme Zeit während meiner Laborarbeit. Auch diese Personen standen mir fast jederzeit mit Rat und Tat geduldig bei Fragen und Zweifeln zur Verfügung. Frau Dr. Konstanze Loddenkemper danke ich für ihre Hilfe bei der Patientenbefragung sowie für die interessante und lehrreiche Zeit in der Osteoporosesprechstunde. Frau Brigitte Wegner war mir eine große Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten, wofür ich ihr recht herzlich danke. Vielen Dank an Herrn Dr. Axel-M. Ladhoff, der für uns die elektronenmikroskopischen Bilder der CCL119-Zellen anfertigte. Außerdem möchte ich Frau Dr. Maren Biehnert und Herrn Dr. Matthias Spengler für die Einführung in die Laborarbeit danken. Der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie an der Charité mit ihrem Direktor Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester danke ich für die Möglichkeit, dass ich im Fachgebiet der Rheumatologie klinisch und wissenschaftlich arbeiten sowie interessante und anregende Erfahrungen sammeln konnte.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin im Juni 2003

(Burkhard Bartholome)

Publikationen

Paper

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A and Buttgereit F (2004): Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis, FASEB J (vol. 18), No. 1, pp. 70-80. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14718388

Abstracts

Bartholome B, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F. Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Expression von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren auf Monozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z Rheumatol 2002, 61.1: VA20

Bartholome B, Kunkel D, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F. Cell surface glucocorticoid receptors: First evidence for presence and induced upregulation in human PBMC. Arthritis Rheum 2001, 44, S302

Bartholome B, Kunkel D, Patschan D, Berki T, Scheffold A, Buttgereit F. Identifikation und differentielle Expression von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Probanden und Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z. Rheumatologie 2001, 60, I62

Vorträge

Bartholome B, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, Buttgereit F. Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Expression von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren auf Monozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. 31. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 18. – 21. 9. 2002, Berlin

Bartholome B, Kunkel D, Bienert M, Berki T, Scheffold A, Buttgereit F. Detection of Membrane Glucocorticoid-Receptor Expression on Peripheral Blood Monocytes Using High-Sensitivity Immunofluorescence. 13th Heidelberg Cytometry Symposium (HCS), Annual Meeting of the German Society of Cytometry (DGfZ), October 19th to 21st 2000